

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS – GRADUAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E  
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA- CITA**

**Propagação *in vitro* e diferentes níveis de sombreamento na aclimatização de  
*Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae)**

**Janaína Medeiros Vasconcelos**

**RIO BRANCO  
2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-  
GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A  
AMAZÔNIA



**Propagação *in vitro* e diferentes níveis de sombreamento na aclimatização de  
*Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae)**

**Janáína Medeiros Vasconcelos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**.

Área de Concentração: Ciências e Inovação Tecnológica

Orientador \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior

Co-orientadora \_\_\_\_\_  
Dra. Andrea Raposo

Rio Branco - Acre  
Agosto 2013

©VASCONCELOS, J. M., 2013.

VASCONCELOS, Janaína Medeiros. **Propagação *in vitro* e diferentes níveis de sombreamento na aclimatização de *Aechmea setigera* Mart. Ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae).** Rio Branco, 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e tecnologia para a Amazônia) – Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e tecnologia para a Amazônia. Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

---

V331p Vasconcelos, Janaína Medeiros, 1988-

Propagação *in vitro* e diferentes níveis de sombreamento na aclimatização de *Aechmea setigera* Mart. Ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae) / Janaína Medeiros Vasconcelos. – 2013. 59 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia. Área de Concentração: Ciências e inovação e tecnológica. Rio Branco, 2013.

Inclui Referências bibliográficas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior.

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andrea Raposo.

1. Bromeliaceae – Propagação *in vitro*. 2. *Aechmea setigera*. 3. Plantas – Efeito da sombra. 4. Aclimatização – Plantas. 5. Genética vegetal. I. Título.

CDD: 635.93422

---

Bibliotecária: Vivyanne Ribeiro das Mercês Neves CRB-11/600

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS – GRADUAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E  
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA- CITA

Janaína Medeiros Vasconcelos

Propagação *in vitro* e diferentes níveis de sombreamento na aclimatização de *Aechmea setigera*  
Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae)

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 21/08/2013

---

Dra. Andrea Raposo (Co-orientadora)  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

Dra. Patrícia Flores  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

Profa. Dra. Candida Elisa Manfio  
UNICRUZ – Universidade de Cruz Alta

Aos meus pais Máximo Filho e Maria Do Socorro, às minhas irmãs Anne Caroline e Jaiane, obrigada por acreditarem em mim, pela admiração e companheirismo nesta etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar a Deus, por estar sempre presente em minha vida, pela fé que me transmite, força e coragem, as quais me incentivaram a realizar este trabalho.

Ao homem mais importante da minha vida, meu melhor amigo, meu pai Máximo Filho que está sempre ao meu lado com seu carinho fraterno. À minha querida amiga e mãe Maria do Socorro, que me transmitiu toda a sua sabedoria e me incentivou com suas sábias palavras: “Acredite no seu potencial”, “Busque os seus objetivos”. Às minhas companheiras, amigas e irmãs Anne Caroline e Jaiane, com todo meu amor e carinho. Obrigada por sempre poder contar. Amo vocês incondicionalmente!

Aos meus grandes amigos Pedro Zanata, Pedro Paulo, Elton, Laisa, Taynara, Marinei, Dayanne, João Manoel, Lays e Tayline que me deram força e carinho, e propocionaram momentos de felicidades e distração para continuar nesta jornada. Amo vocês!

Às amizades construídas na Embrapa-Acre, em especial ao Robert Thompson, por estar sempre presente como um grande amigo nos momentos que mais precisei, à Renata Beltrão, pelo seu amor e carinho, à Tatiana Campos, pela amizade e conhecimento, às minhas amigas e companheiras de mestrado e laboratório (LABMOL) Vanessa e Hellen, por estarem sempre ao meu lado. Ao meu grande amigo João Ricardo, por ter se tornado especial desde o momento que o conheci. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Dra Andréa Raposo, que se tornou uma grande amiga, e com seu carinho e amor de mãe que me ensinou, ajudou e incentivou a crescer profissionalmente e acreditou no meu potencial. Se cheguei até aqui, devo muito a você.

Ao meu querido e sábio orientador, professor Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior, pela oportunidade, reconhecimento e aprendizado.

À Universidade Federal do Acre, em especialmente, ao programa de Pós-graduação em Ciências, Inovação e Tecnologia para Amazônia-CITA e a todo corpo docente, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Embrapa Acre, pela oportunidade de desenvolver as atividades em seu campus experimental e utilizar das suas instalações.

A todos que contribuíram no andamento deste trabalho e tornaram possível a sua realização.

“Senhor, dê-me a serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar as que posso, e sabedoria para reconhecer a diferença entre elas! Vivendo um dia de cada vez, desfrutando um momento de cada vez...”

**Reinhold Niebuhr**

## RESUMO

As Bromeliaceae consistem em um subsistema ecológico complexo que contribui para a manutenção da estabilidade dos ecossistemas florestais. A sua utilização para fins ornamentais e comerciais, bem como as atividades de desmatamentos das Florestas Tropicais, causa uma redução na sua biodiversidade, o que pode levar à extinção de espécies. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas morfológicas na multiplicação *in vitro* de brotos de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. sob efeito de diferentes citocininas; comparar a eficiência dos sistemas de cultivo; avaliar a utilização das auxinas AIA e AIB no enraizamento *in vitro*; bem como a aclimatização de plantas micropropagadas sob diferentes níveis de sombreamento. Plântulas germinadas e desenvolvidas *in vitro* foram utilizadas para experimentos de multiplicação, inoculadas em meio de cultura MS acrescido das citocininas BAP, 2-iP e CIN em diferentes concentrações (0; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,7  $\mu\text{M}$ ), e em diferentes sistemas de cultivo (semissólido, dupla-fase e líquido estacionário sob ponte de papel) sobre diferentes concentrações de BAP (0; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,7  $\mu\text{M}$ ). O enraizamento *in vitro* das plântulas, foi realizado em meio MS com diferentes concentrações de auxinas (0; 2,46; 4,92; 9,84  $\mu\text{M}$ ). Após 30 dias, as mesmas foram aclimatizadas em vasos plásticos com substrato Plantmax Florestal<sup>®</sup>, em viveiro sobre sombrites com diferentes níveis de sombreamento (20, 30, 50 e 75%). A multiplicação *in vitro* de *Aechmea setigera* em meio semissólido com diferentes concentrações de citocininas, demonstrou que o uso do BAP a 2,2; 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$  proporciona o maior número de brotos, porém o maior comprimento destes ocorre em meio isento ou a 17,7  $\mu\text{M}$  de BAP. Quando se compara os três sistemas de cultivo sobre as diferentes concentrações de BAP, o sistema dupla-fase na ausência ou presença deste regulador de crescimento a 2,2; 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$ , proporciona a maior taxa de multiplicação e o maior número de folhas, não apresentando diferença significativas para estas concentrações. O sistema semissólido mostra-se melhor para a variável comprimento de broto na ausência ou a 17,7  $\mu\text{M}$  de BAP. O sistema líquido estacionário demonstrou-se inferior em todas as variáveis analisadas. No enraizamento *in vitro* desta espécie a utilização de 4,9 ou 9,8  $\mu\text{M}$  de AIB proporciona a produção de raízes e de brotos com maior comprimento. A maior taxa de sobrevivência das mudas nos tempos de aclimatização estudados ocorreu em sombrite com 30 e 50% de sombreamento, estas mudas apresentaram-se visualmente, plantas de *A. setigera* com características mais vigorosas.

**Palavras-chaves:** Bromeliaceae, *Aechmea setigera*, micropropagação e níveis de sombreamento.



## ABSTRACT

The Bromeliaceae consist of a complex ecological subsystem which helps to maintain the stability of forest ecosystems. Its use for ornamental purposes and commercial activities as well as the deforestation of tropical forests cause a reduction in biodiversity, which could lead to the extinction of species. The aim of this study was to evaluate the morphological responses in vitro multiplication of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. shoots under the effect of different cytokinins; compare the efficiency of farming systems; evaluate the use of auxins IAA and IBA on in vitro rooting and acclimatization of micropropagated plants under different levels of shading. Germinated and developed in vitro seedlings were used for multiplication experiments, inoculated in MS medium plus the cytokinins BAP, 2-iP and CIN in different concentrations (0, 2.2, 4.4, 8.8 and 17.7 mM), and different cropping systems (semi-solid, dual-phase and liquid phase in paper bridge) on different concentrations of BAP (0, 2.2, 4.4, 8.8 and 17.7 mM). Seedling in vitro rooting was performed on MS medium with different concentrations of auxin (0, 2.46, 4.92, 9.84 mM). After 30 days they were acclimatized in plastic pots with Plantmax Forest<sup>®</sup> in nursery under shadow protection with different shading levels (20, 30, 50 and 75%). In vitro multiplication of *Aechmea setigera* in semisolid medium with different concentrations of cytokinins demonstrated that the use of BAP at 2.2, 4.4 and 8.8 mM provides the highest number of shoots, but their greatest length occurs in middle exempt or 17.7 mM BAP. When comparing the three cropping systems on different concentrations of BAP, the dual-phase system in the absence or presence of this growth regulator to 2.2, 4.4 and 8.8 mM provides the highest multiplication rate and the largest number of leaves, showing no significant difference for these concentrations. The semisolid system looks better for the variable length of bud in the absence or 17.7 mM BAP. The stationary liquid system demonstrated to be lower in all variables. It is necessary to use 4.9 or 9.8 mM IBA for the production of roots and shoots of greater length during in vitro rooting. The highest rate of seedling survival in acclimatization seasons occurred in shadow protections with 30 and 50% shading. These seedlings visually present as plants of *A. Setigera* with stronger features in these environments.

**Keywords:** Bromeliaceae, *Aechmea setigera*, micropropagation and shading levels.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Família Bromeliaceae e <i>Aechmea setigera</i></b>	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Cultura de Tecidos Vegetais</b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>Micropropagação de Bromeliaceae</b>	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>Aclimatização de plantas micropropagadas</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Aechmea setigera</i></b>	<b>26</b>
3.1.1	Efeito de diferentes citocininas (BAP, 2-iP e CIN) e concentrações (0; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,7 µM) sobre a multiplicação <i>in vitro</i>	26
3.1.2	Efeito de sistemas de cultivo <i>in vitro</i> sobre a multiplicação	27
<b>3.2</b>	<b>Enraizamento <i>in vitro</i> de <i>A. setigera</i></b>	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>Aclimatização sob diferentes níveis de sombreamento</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Aechmea setigera</i></b>	<b>34</b>
4.1.1	Efeito de diferentes citocininas (BAP, 2-iP e CIN) e concentrações (0; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,7 µM) sobre a multiplicação <i>in vitro</i>	34
4.1.2	Efeito de sistemas de cultivo <i>in vitro</i> sobre a multiplicação	36
<b>4.2</b>	<b>Enraizamento <i>in vitro</i> de <i>A. setigera</i></b>	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b>Aclimatização sob diferentes níveis de sombreamento</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A América do sul concentra a maior biodiversidade de todos os continentes (SÁ, 2009), sendo o Brasil considerado o país mais biodiverso (MOREIRA, 2008). A biodiversidade é representada por plantas, animais, microrganismos, e a interação destas espécies com os ecossistemas e os processos ecológicos dos quais fazem parte (GOEDERT, 2007). O Brasil possui mais de 56 000 espécies de plantas, com quase 19% da flora mundial, e é considerado o país com a flora mais rica do mundo (GIULIETTI et al., 2005). Dentre os biomas brasileiros com alta biodiversidade, destacam-se a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica. Nas florestas tropicais, a diversidade de plantas epífitas compreende cerca de um terço das plantas vasculares. Estas estabelecem todo ou parte do seu ciclo de vida sobre troncos, galhos, ramos e folhas das árvores, não sendo parasitas (BENZING, 1990). Ainda o mesmo autor relata que dentre as epífitas, as espécies da família Bromeliaceae e Orchidaceae são as mais representativas.

A família Bromeliaceae compreende 58 gêneros em 3172 espécies e subespécies (LUTHER, 2008; GIVNISH et al., 2011). Desse total, 40 % das espécies são encontradas em território brasileiro (MOLLO et al., 2011). A maior riqueza de espécies dessa família ocorre na Floresta Atlântica, sendo que nas regiões Sul e Sudeste existem populações com elevado endemismo (REITZ, 1983; MARTINELLI, 2000). As bromeliáceas da Amazônia são em geral pouco conhecidas (NARA & WEBBER, 2002; QUARESMA & JARDIM, 2012). De acordo com Smith (1955), ocorrem 64 espécies em 14 gêneros para toda a região.

Na Amazônia brasileira os representantes de bromélias são encontrados com maior frequência em locais de vegetação de baixios, campina, campinarana e igapó (SOUSA & WANDERLEY, 2007). Nesses ecossistemas elas são exclusivamente epífitas (QUARESMA & JARDIM, 2012). Destaca-se para os estudos das Bromeliaceae da Amazônia o levantamento da Flora da Reserva Ducke, realizado por Ribeiro et al. (1999), onde foram registrados 7 gêneros e 13 espécies. Recentemente, estudos de diversidade de bromeliáceas na Amazônia Oriental (Pará) indicam que a maior riqueza de espécies ocorre nos gêneros *Tillandsia* L. e *Aechmea* Ruiz & Pav (QUARESMA & JARDIM, 2012). Ainda nesse mesmo estudo, as espécies *Aechmea setigera* e *Aechmea mertensii* demonstram elevada frequência na Amazônia.

No Estado do Acre, a família Bromeliaceae está representada por 29 espécies em 9 gêneros (DALY & SILVEIRA, 2008). A espécie *Aechmea setigera* é encontrada na Amazônia Sul-Occidental (Acre), conforme as coletas realizadas por Daly & Silveira (2008). De acordo com Tamaki et al. (2007), o Diário Oficial do Estado de São Paulo, de 22 de setembro de 2004, publicou uma lista de espécies vegetais na qual *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. está presumivelmente extinta. Portanto, estudos que visem a conservação e a propagação dessa espécie são de extrema importância.

As bromélias consistem em um subsistema ecológico complexo, que contribui para a manutenção da estabilidade dos ecossistemas florestais em função do seu alto grau de especialização e de sua adaptação às condições climáticas e oligotróficas extremas (BENZING, 2000; RECH FILHO et al., 2005; ARANDA-PERES & RODRIGUES, 2006). A sua utilização para fins ornamentais e comerciais, bem como as atividades de desmatamentos das florestas tropicais, causam uma redução na sua biodiversidade (RECH FILHO et al., 2005), o que pode levar à extinção de espécies.

Com as exigências do mercado competitivo, há a necessidade de desenvolver técnicas mais adequadas ao cultivo de bromélias (AMARAL et al., 2009). A micropropagação é uma metodologia de escolha para alcançar a rápida multiplicação destas espécies (HUANG et al., 2011), uma alternativa importante para minimizar as atividades extrativistas (ROSA, 2010). As técnicas de cultura de tecidos vegetais possibilitam, através de um conjunto de estratégias, a propagação massal e conservação das espécies (REICH FILHO et al., 2005). A utilização de sementes como fonte inicial de explante consiste numa estratégia importante para a conservação, mantendo a variabilidade genética das espécies (RECH FILHO et al., 2005; SILVEIRA et al., 2009).

O estabelecimento e os sistemas regenerativos *in vitro* de uma espécie estão submetidos a diversos fatores importantes, como os nutrientes minerais e reguladores de crescimento no meio de cultura e o seu estado físico, uma vez que altera o contato dos explantes com o meio (MENGARDA et al., 2009). Ainda a mesma autora afirma que a utilização de meios de cultura líquidos, ou seja, sem a adição do ágar, tem proporcionado igual ou até maior eficiência para diversas espécies vegetais. Segundo Willadino e Câmara (2007), os meios líquidos devem ser mantidos sob agitação para assegurar a aeração dos explantes; ou sobre um suporte de algodão ou ponte de papel, evitando que fiquem submersos. Outra forma de estado físico do sistema de

cultura é o dupla-fase, que consiste em adicionar meio líquido sobre o meio semissólido contendo os explantes ao longo do período de cultivo dos mesmos (PEREIRA et al., 2012).

A adição de reguladores de crescimento no meio de cultura é fator importante para o crescimento e desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultivo, sendo auxinas e citocininas as classes mais utilizadas (CALDAS et al., 2006). Para Kievitsbosch (2011), cada espécie possui suas exigências nutricionais, e o meio de cultura deve ser adequado à espécie a ser propagada.

A fase de aclimatização, etapa final do cultivo *in vitro*, é um processo crucial na micropropagação, tendo grande importância na formação de mudas de qualidade (BANDEIRA et al., 2007; AOYAMA et al., 2012).

Levando em consideração a importância econômica e ecológica das bromeliáceas e o sucesso da propagação *in vitro* destas, este trabalho teve como objetivo avaliar as respostas morfológicas na multiplicação *in vitro* de brotos de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f., sob efeito de diferentes citocininas; comparar a eficiência dos sistemas de cultivo em meio semissólido, dupla-fase e líquido estacionário sob ponte de papel; avaliar a utilização das auxinas AIA e AIB no enraizamento *in vitro*; bem como a aclimatização de plantas micropropagadas sob diferentes níveis de sombreamento.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Família Bromeliaceae Juss. e *Aechmea setigera*

A família Bromeliaceae é típica das zonas tropicais e subtropicais das Américas (MOREIRA, 2008). Possui plantas que impressionam por suas formas exuberantes, pela gama de cores e variedades de flores (FERREIRA et al., 2005), representando formas de vida terrestre, epífita ou rupícola (VERSIEUX et al., 2008). Atualmente, a família Bromeliaceae Juss. está dividida em oito subfamílias: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae, Bromelioideae (GIVNISH et al., 2011).

A família Bromeliaceae é considerada a segunda maior família de monocotiledôneas epífitas, perdendo somente para a Orchidaceae. As bromélias têm uma ampla diversidade ecológica, podendo ser encontradas em uma variedade de habitats que vão desde desertos quentes e secos, até florestas úmidas e regiões montanhosas mais frias. As espécies de epífitas são encontradas normalmente sobre outras plantas, que podem ser arbóreas, arbustivas ou cactáceas, até mesmo sobre postes ou telhados (MANETTI et al., 2009).

As epífitas possuem folhas em rosetas, formando tanques que acumulam água e detritos, sendo que estas têm espinhos. Seus frutos são do tipo baga, e as sementes são dispersas por animais. Muitas espécies de epífitas servem como habitat para animais, como anfíbios, aranhas e insetos (KIEVITSBOSCH, 2011). Na Amazônia brasileira, as bromeliáceas são exclusivamente epífitas, não havendo muitos estudos sobre a diversidade em várzeas estuarinas amazônica destas plantas (QUARESMA & JARDIM, 2012).

O gênero *Aechmea*, um dos maiores da família, é pertencente à subfamília Bromelioideae, possui cerca de 200 espécies (ROSA, 2010). As plantas deste gênero são tipicamente neotropicais, possuem porte herbáceo, atingindo entre 40 e 80 cm de altura e sendo muito utilizadas na ornamentação de paisagens domésticas (FARIA, 2011). A reprodução se dá por brotamento do rizoma e por sementes (MOREIRA, 2008).

A espécie *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Figura 1) tem distribuição natural na Amazônia Sul-Occidental no Estado do Acre (Daly & Silveira, 2008). É uma bromélia

epífita, típica de florestas húmidas, e desenvolve frutos de dezembro a fevereiro. Suas folhas medem de 65 a 110 cm. Possuem brácteas mais largas do que os entrenós, são foliáceas, verde-amarelado. Possui inflorescência que tem de 25 a 70 cm, aparentemente simples, glabrada, multiflora. As flores são sésseis ou subsésseis. Suas sépalas medem de 14-18 mm, agudas para obtuso, glabras e suas pétalas são verde-amarelado (MORALES, 2001).



**Figura 1** - *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. sobre forófito em pastagem, na Estrada Transacreana AC-90, Km 10 (S 10°01' 16.9" e W 067° 55' 26.6"), no município de Rio Branco- AC.

Conhecidas popularmente como “gravatás”, as bromélias brasileiras já eram conhecidas pelos índios, que as chamavam de “carauá”, “carandá” ou “caraguá” (PAULA, 2000). Segundo Rocha (2002), as bromélias são de valor ornamental por excelência, não requerendo muitos cuidados e com grande resistência. Para Ferreira et al. (2005), o valor ornamental destas espécies pode tornar o Brasil um grande exportador mundial, já que estas plantas despertam interesse em outros continentes.

Galvanese et al. (2007) acredita que o cultivo destas plantas pode trazer benefícios como a redução do extrativismo predatório de bromélias nativas, o que leva a conservação das mesmas em seu ambiente natural. Moreira et al. (2006) apresentam que a família bromeliácea tem importância econômica, pois visa atender à utilização em decorações de interiores e projetos paisagísticos.

Conforme Faria (2011), as bromélias têm importância ecológica, pois são consideradas bons indicadores ambientais. Em regiões tropicais a maioria de suas espécies é epífita, estas são as primeiras plantas afetadas pelas degradações e derrubadas das florestas, e estão entre as últimas a se estabelecerem nas áreas de recuperação (MOREIRA, 2008).

## **2.2 Cultura de Tecidos Vegetais**

A propagação *in vitro* ou micropropagação, é uma técnica de cultura de tecidos vegetais, que utiliza explantes de tamanho reduzidos (SANTOS, 2009), nela ocorre a cultura de tecidos, células ou órgãos provenientes de plantas conduzidas em condições assépticas, desenvolvidas em meio nutritivo, e mantidas em sala de crescimento sob controle de luminosidade, temperatura e fotoperíodo (GEORGE et al., 2008; SILVA, 2010).

Essa técnica permite a produção de mudas uniformes de alta qualidade e livres de patógenos, permitindo a rápida multiplicação, preservação e propagação de espécies ameaçadas de extinção (RECH FILHO, 2004). Para Bencke e Droste (2008), a homogeneidade genética depende do tipo de explante escolhido, e a utilização de sementes garante a conservação da diversidade genética.

Kerbaui (1998) afirma que a cultura de tecidos vegetais tem todo amparo na totipotencialidade, o que significa dizer que teoricamente qualquer tecido do organismo vegetal contendo informações genéticas necessárias possibilitará a regeneração de uma planta completa. Este processo garante a rápida multiplicação de plantas em um curto intervalo de tempo; possibilita a propagação de clones independentes da época do ano; e permite a propagação de espécies que dificilmente seriam propagadas pelos métodos convencionais, suprimindo as



necessidades dos produtores de flores e plantas ornamentais com qualidade comprovada (BARRUETO CID, 2001).

A propagação *in vitro* de uma espécie está submetida a diversos fatores, entre eles, os nutrientes minerais e reguladores de crescimento presentes no meio de cultura, e o estado físico do meio, que interferem de forma efetiva no estabelecimento *in vitro* da espécie (FORTES & PEREIRA, 2001). Mengarda et al. (2009) ressaltam que a alteração do estado físico do meio de cultura modifica a resistência física de contato dos explantes com o meio, influenciando no desenvolvimento das plântulas *in vitro*.

Pereira & Fortes (2003) afirmam que o maior contato do explante com o meio de cultura ocorre no meio líquido, pois este proporciona uma maior disponibilidade de água e nutrientes quando comparados ao meio semissólido. Ainda conforme os mesmos autores, as vantagens estão relacionadas ao favorecimento da taxa de assimilação dos nutrientes, altura, multiplicação dos brotos, e um maior acúmulo de massa seca. Para Willadino e Câmara (2007), os meios líquidos devem ser mantidos sob agitação, assegurando a aeração dos explantes, ou sobre um suporte de algodão ou ponte de papel, evitando que fiquem submersos.

O uso do meio dupla-fase sugerido por Pereira et al. (2012) no protocolo de multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro (*Ananas cosmosus*), tem demonstrado melhoria no cultivo desta espécie. O qual consiste na adição de porções de meio líquido ao longo do período de cultivo sobre o meio semissólido contendo o explante. Esta estratégia proporciona uma melhoria na técnica de micropropagação devido os explantes permanecerem no mesmo recipiente por um longo período de tempo, sendo possível eliminar a necessidade constante de subculturas, reduzir a manipulação de gemas, diminuir o número de frascos e a quantidade de espaço no laboratório.

Para Pullman & Skryabina (2007), o meio dupla-fase proporciona um aumento na área de superfície do explante, ocasionando maior difusão, absorção e substituição dos componentes do meio de crescimento, que conduz a melhora na resposta das culturas *in vitro*. A multiplicação *in vitro* em sistema de cultura dupla-fase tem sido efetiva para a taxa de multiplicação de frutíferas, em número e tamanho de brotações, como a de *Pyrus calleryana* D-6 (MORAES et al., 2004) e a de macieira Marubakaido (MACHADO et al., 2004).

O ágar é utilizado como agente solidificante do meio de cultura (SILVA, 2010). No entanto ele pode dificultar o contato do explante com o meio, reduzindo a absorção dos componentes (PEIXOTO & PASQUAL, 1995; OLIVEIRA, 1994).

O meio líquido tem proporcionado resultados superiores ou iguais aos obtidos em meio semissólido para diversas espécies vegetais (SILVA, 2010). Portanto, o estado físico do meio de cultura pode estar relacionado com o desempenho assimilatório das plantas durante o cultivo *in vitro*. O estabelecimento de um protocolo de micropropagação depende da espécie em estudo, pois as características genéticas de cada uma podem responder diferente sob as mesmas condições de cultivo, estabelecendo assim o melhor meio de cultura para determinada espécie (ZIV, 1995). Alguns trabalhos têm sido realizados avaliando o estado físico do meio de cultura em bromeliáceas (SCHERER et al., 2013).

Camolesi et al. (2010) estudaram o efeito da consistência do meio de cultura sobre a multiplicação *in vitro* de banana maçã, verificando os melhores resultados para o número de brotos e touceiras em meio líquido. Os mesmos autores afirmam que a utilização deste meio pode tornar a técnica mais barata. Também foram realizados estudos de enraizamento *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa sp.*) em diferentes meios de cultivo, apresentando o melhor desenvolvimento radicular em meio semissólido e o maior número de raízes em cultivo líquido (CAMOLESI et al., 2010). Pereira & Fortes (2003), demonstraram que a batata se desenvolve melhor em meio semissólido.

Scheidt et al. (2009) realizaram trabalho de multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) testando o uso de biorreatores em diferentes sistemas de cultivo e apresentaram o uso do biorreator de imersão por bolhas (BIB®) como uma alternativa favorável.

Os reguladores de crescimento são utilizados em diferentes concentrações e combinações com o objetivo de garantir a produção das mudas. As combinações entre o uso de reguladores vegetais e o tipo de explante são definidas de acordo com a resposta morfogênica desejada (AOYAMA et al., 2012). A composição dos meios nutritivos utilizados na cultura dos tecidos vegetais tem a finalidade de disponibilizar as substâncias necessárias ao crescimento e desenvolvimento *in vitro* (SILVA, 2010).

Hormônios vegetais são compostos químicos endógenos que são transportados para células responsivas, atuando diretamente na expressão de muitos genes (FARIA, 2011). Quando sintéticos são considerados reguladores de crescimento, com funções semelhantes aos hormônios vegetais, e devem ser adicionados ao meio nutritivo em concentrações baixas (SILVA, 2010). Torres et al. (1998) e Borgatto & Hayashi (2002) explicam que a adição de reguladores de

crescimento no meio visa suprir a falta dos teores endógenos de hormônios vegetais, que nos explantes encontram-se desligados das regiões produtoras nas plantas matriz.

Para Galvanese et al. (2007), as auxinas e citocininas controlam os principais eventos celulares e, quando usadas em concentrações adequadas no meio nutritivo, se tornam um fator determinante no crescimento e sobre o padrão de desenvolvimento de culturas *in vitro*. A alta relação citocinina/auxina favorece a multiplicação de brotos, e uma relação menor proporciona a formação de raízes (GEORGE, 1993). As citocininas são produzidas nas raízes e desempenham amplo papel, tanto nos tecidos vegetais como na diferenciação de brotos. As auxinas são produzidas no meristema apical caulinar, em folhas jovens, frutos em desenvolvimentos e sementes, e atuam na divisão celular (NASCIMENTO, 2007; KERBAUY, 2008; TORRES, 1999).

As citocininas podem mostrar diferenças entre si, como o BAP (6-benzilaminopurina), que induz a formação de muitas brotações e altas taxas de multiplicação na micropropagação, e a KIN (cinetina) e o 2-iP (isopenteniladenina), que causam apenas o crescimento normal, sem brotações múltiplas (CALDAS et al., 1990). Segundo Torres et al. (1998), o BAP é a citocinina mais utilizada, devido a sua relação com a formação de brotos.

Para Caldas et al. (1998), as auxinas ANA (ácido naftalenoacético), AIA (ácido indolilacético), AIB (ácido indolilbutírico) e 2,4- D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético) proporcionam diferentes respostas nos sistemas de cultivo *in vitro*.

### **2.3 Micropropagação de Bromeliaceae**

A propagação das bromélias pode ocorrer de forma assexuada ou sexuada, onde a estratégia assexuada ou propagação vegetativa forma brotos provenientes de planta matriz que surgem da base da planta por estolhos ou rizomas, ou do interior da roseta da planta. A estratégia sexuada é por meio de sementes, gerando variabilidade genética (SILVA, 2010).

Aoyama et al. (2012) ressalta que a propagação de bromélias por meio de sementes, dependendo da espécie cultivada, pode não ser capaz de fornecer um elevado número de plantas num curto intervalo de tempo. O cultivo por meio desse sistema não supre a demanda de sua

comercialização para o mercado consumidor (SANTOS et al., 2005). A técnica de cultivo *in vitro* de plantas ornamentais é uma estratégia para a sua conservação, pois possibilita maior fornecimento ao mercado, diminuindo a procura por indivíduos provenientes da natureza (TAMAKI et al., 2011). Sendo assim, a micropropagação consiste numa escolha para a rápida multiplicação de bromélias (HUANG et al., 2011).

Kanashiro et al. (2009) ressaltaram que a formação de plântulas em bromélias ornamentais, via cultivo *in vitro*, tem como material propagativo viável gemas apicais de brotos, gemas axilares e folhas removidas de plântulas adultas. Recentemente, a indução de nódulos organogênicos (culturas nodulares) e a regeneração de brotos em Bromeliaceae foram descritas com o propósito de multiplicação massal (SCHERER et al., 2013). E o uso de sementes é possível e vem sendo apontado como vital na conservação de germoplasma de bromélias ameaçadas de extinção, assegurando a variabilidade genética dessas espécies.

A propagação *in vitro* de bromélias vem mostrando um grande potencial quando comparado aos métodos convencionais de propagação. A técnica de propagação *in vitro* permite uma rápida multiplicação geneticamente segura de um elevado número de plantas, a qual corresponde com à grande demanda do mercado (SANTA-ROSA et al., 2013). O uso de segmentos nodais obtidos de plantas *in vitro* constitui uma alternativa para a produção de clones (SANTOS et al., 2010).

Vários trabalhos de micropropagação de bromélias foram realizados com diferentes espécies, entre as quais *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* (ALVES & GUERRA, 2001), *Dyckia distachia* (POMPELLI & GUERRA, 2004), *Neoglaziovia variegata* (SILVEIRA et al., 2009); *V. inflata* (PEDROSO et al., 2010); *V. reitzii* (DAL VESCO & GUERRA, 2010); *Billbergia zebrina* (DAL VESCO et al., 2011), *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. F (FARIA, 2011), *Aechmea blanchetiana* e *Aechmea distichantha* (SANTA-ROSA et al., 2013), que verificaram que o uso desta técnica é eficiente para a rápida multiplicação.

A micropropagação de Bromeliaceae também pode ser realizada a partir de sementes como em *Pitcairnia flammea*, *Vriesea fosteriana* e *Tillandsia pohliana* (NIEVOLA et al., 2001), *Vriesea reitzii* (RECH-FILHO et al., 2005), *Tillandsia eizii* (PICKENS et al., 2003 e PICKENS et al., 2006), *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis* (BELLINTANI et al., 2007). Por meio da utilização de gemas axilares (ALMEIDA, 2002; SILVA et al., 2004), segmentos

caulinares com uma ou mais gemas (KISS et al., 1995; MENDES et al., 2007), segmentos foliares (FONSECA et al., 1999).

Na propagação de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivada *in vitro* e *ex vitro*, utilizando sementes como fonte de explante, Aoyama et al. (2012) mostraram que o cultivo *in vitro* é o método mais eficiente para a produção de mudas dessa espécie.

Para otimizar um protocolo de micropropagação de plantas de *Vriesea gigantea* Gaudich. (Bromeliaceae), Bencke & Droste (2008) obtiveram plântulas proveniente de sementes cultivadas em meio MS suplementado com BAP e ANA, tendo 100% de germinação. Esses autores obtiveram a maior taxa de multiplicação na presença desses reguladores. Gavalnese et al. (2007), em estudos com a bromélia da mata Atlântica *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, buscaram verificar o efeito de reguladores vegetais ANA e BAP e ágar no desenvolvimento *in vitro*. Esses autores concluíram que o maior número de brotações foi obtido em meio líquido com 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, e em meio semissólido com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Verificaram também que quanto maior for o aumento da concentração de ANA, maior será o tamanho das raízes, e menor o comprimento de folhas.

Barbosa et al. (2009) estudaram o cultivo inicial de gemas axilares de *Ananas comosus* (L.) Merr., em meio líquido e sólido, na presença e ausência de luz, identificaram que o meio de cultura líquido proporcionou os melhores resultados para a regeneração de brotos e plantas em fases subsequentes de um sistema de micropropagação. Em estudos do estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae, Merganda et al. (2009) concluíram que o cultivo em meio líquido estático proporcionou maior taxa de multiplicação das espécies, quando comparado aos cultivos em meio líquido sob agitação e semissólido.

Pompelli & Guerra (2005), estudando o enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* Hassler sob diferentes concentrações de AIB a partir de brotações micropropagadas, verificaram que essas devem ser enraizadas *in vitro* na presença do regulador avaliado. Dias et al. (2010) com abacaxizeiro “ananás-do-campo”, concluíram que o enraizamento *ex vitro* das plântulas pode ser realizado sem a imersão em solução de AIB, as mesmas dispensam a etapa de enraizamento *in vitro*. Pereira et al. (2008), em seu trabalho com *Ananas erectifolius* (Bromeliaceae), obtiveram 98% de plântulas regeneradas, formando raízes quando cultivadas em meio líquido sem a presença de reguladores de crescimento, sobrevivendo todas as mudas aclimatizadas em casa de vegetação.

Para avaliar a sobrevivência das mudas de abacaxi ornamental (*Ananas bracteatus* Schult.f.) na fase de aclimatização, Oliveira et al. (2010) avaliaram diferentes concentrações de sacarose no meio de enraizamento *in vitro*, e concluíram que a presença de sacarose neste meio é necessário para a sobrevivência das plantas em casa de vegetação.

## 2.4 Aclimatização de plantas micropropagadas

A aclimatização, fase que as plantas cultivadas *in vitro* são transferidas para as condições *ex vitro*, é uma etapa crucial na micropropagação. As plântulas cultivadas *in vitro*, quando submetidas a condições naturais de cultivo, devem ter a mesma capacidade de sobrevivência (GEORGE et al., 2008; AOYAMA et al., 2012).

Para Chandra et al., (2010), a grande limitação da propagação é a alta mortalidade das plantas micropropagadas durante ou após a transferência das mesmas para as condições *ex vitro*. Oliveira et al., (2010) dizem que vários são os fatores que podem contribuir para o bom índice de sobrevivência destas plantas, garantido assim o sucesso da aclimatização.

As plantas ao serem transferidas para as condições *ex vitro* passam por um estresse abiótico (de um ambiente de baixa transpiração e irradiância, e elevada umidade relativa) e biótico (microflora do solo) (DEB & IMCHEN, 2010; AOYAMA et al., 2012), além de passarem do mecanismo heterotrófico para autotrófico (PASQUAL, 2001).

Outros fatores que podem influenciar na aclimatização das plantas são o manejo da irrigação, as variedades de substratos e os recipientes. Como a água é um dos principais fatores que limita a produção das plantas, sua quantidade e frequência de aplicação são fundamentais para o desenvolvimento das mudas propagadas *in vitro*. Os substratos influenciam as respostas das plantas através de um controle de nutrição mineral e de irrigação, além da redução de problemas relacionados com salinização, pragas e doenças (BOMFIM, 2006). Os recipientes proporcionam um melhor aproveitamento de espaço físico, facilitam os manejos culturais, protegem as raízes de danos mecânicos, permitem a economia de substrato, além de maximizarem a sobrevivência no campo (BOMFIM, 2006).

Além dos fatores mencionados acima, a luminosidade influencia no desenvolvimento dos vegetais (TAIZ & ZEIGER, 2008). Atroch et al. (2001) afirmam que a luz é primordial para o crescimento das plantas, fornecendo sinais que regulam o desenvolvimento, e que modificações nos níveis de irradiância podem levar a diferentes respostas fisiológicas.

Rocha et al. (2008) afirmam que a rizogênese é considerada uma fase crítica na regeneração de plantas *in vitro*, pois são as raízes que determinam a sobrevivência das plantas durante a aclimatização. Os mesmos autores estudaram o enraizamento *in vitro* e a aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.) e os resultados mostram que a auxina AIB, na concentração 9,8  $\mu\text{M}$ , foi eficiente para a indução de enraizamento, e que o substrato Ecoterra<sup>®</sup> proporcionou os melhores resultados para as plantas aclimatizadas.

Agnihotri et al. (2004) obtiveram 80% de sucesso no transplântio de mudas de mamoeiro cultivadas *in vitro*. Augusto et al. (2006), avaliando o método de aclimatização de amoreira preta cv. Brazos após o enraizamento *in vitro*, testaram dois fatores: a presença ou ausência de sacarose na etapa de enraizamento e o local de aclimatização (em câmara de nebulização ou em túnel plástico sem nebulização), e obtiveram 100% de sobrevivência em todos os métodos testados, sendo que as plântulas quando enraizadas podem ser aclimatizadas em túnel plástico, sem a necessidade de nebulização, ou ainda enraizadas *ex vitro* e aclimatizadas em casa de vegetação com nebulização intermitente.

Para selecionar o melhor substrato para aclimatização de plântulas de *Plaffia glomerata* produzidas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose, Skrebsky et al. (2006) verificaram que 40 a 60  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose promovem o maior índice de aclimatização, e o uso de vermiculita média com solo (1:1 v/v) e PlantMax<sup>®</sup> com solo (1:1 v/v) promoveram o melhor crescimento destas plantas na última fase de aclimatização sob sombrite.

Silva et al. (2006) avaliaram o efeito de diferentes substratos na fase de aclimatização de *Dyckia marítima* provenientes de cultivo *in vitro*, e verificaram que estas podem ser aclimatizadas por um período de 120 dias. Huang et al. (2011) trabalharam com a micropropagação da bromélia *Aechmea fasciata*, e verificaram que quando estas eram transplantadas para vasos obteve-se até 95% de sobrevivência e o número máximo de raízes adventícias, sendo cultivadas com sucesso em estufa. Silveira et al. (2013) em seu experimento de aclimatização de caroá concluíram que estas se desenvolveram melhor em substrato

PlantMax<sup>®</sup>, e que a pré-aclimatização favoreceu o crescimento das plantas, reduzindo o tempo de aclimatização das mudas.

Bomfim (2006) evidenciou o melhor desenvolvimento das mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental quando irrigadas com as lâminas de água de 1 milímetro até os 52 dias após o transplântio (DAT), e de 2 mm até os 83 DAT, com duas irrigações diárias em telado, com substrato formado pela combinação de pó-de-coco seco com húmus de minhoca, na proporção de 3:1, cultivadas em tubetes de 180 cm<sup>3</sup>.

Rocha (2002) avaliou o desenvolvimento de bromélias micropropagadas em ambientes protegidos com telas de polipropileno preta em diferentes alturas e níveis de sombreamento, e verificou que a espécie *Aechmea fasciata* se desenvolveu melhor em telas de 40%, enquanto a *Guzmania lingulata* proporcionou os melhores resultados em sombreamento de 60 e 80%. Pires (2008) avaliou o efeito de diferentes níveis de sombreamento (25, 50, 75% e pleno sol) sobre as características morfofisiológicas de *Passiflora morifolia* Mast., *Passiflora suberosa litoralis* (Kunth) K. e *Passiflora palmeri* var. *sublanceolata*, e verificou que as três espécies em estudo foram influenciadas pelo sombreamento, apresentando diferenças de aclimatização entre si.

Rodrigues et al. (2005) avaliaram o comportamento de helicônias micropropagadas no processo de aclimatização, em diferentes substratos e níveis de sombreamento (pleno sol, 30, 40, 50, 60, 70 e 80%), e verificaram desempenho superior dessas mudas nos substratos areia lavada e PlantMax<sup>®</sup>, nas condições de sombreamento a partir de 50%, em especial 70% e 80%. As plantas aclimatizadas desenvolveram novas raízes, enquanto as raízes persistentes do cultivo *in vitro* necrosaram.

Em experimento realizado com orquídeas *Dendrobium phalaenopsis* var. *compactum* para identificar as melhores condições de luminosidade, foram utilizadas telas de 30, 40, 50 e 70% de sombreamento, que corresponderam às médias diárias de intensidade luminosa de 8 300, 6 200, 5 600, 4 500 lux, respectivamente. Verificou-se que as plantas em condições de luminosidade ao redor de 8 300 lux, que corresponde a 30% de sombreamento, apresentaram melhor desenvolvimento e características de flores (Rech et al. 2010).

Para as plantas obtidas *in vitro* e transferidas para aclimatização é necessário uma composição nutricional adequada, pois as bromélias são adaptadas a ambientes com baixa disponibilidade nutricional (SANTOS et al., 2010). Geralmente plantas epífitas apresentam sistema radicular reduzido (Smith & Downs 1979, Reitz 1983). As bromélias possui algumas



adaptações foliares, como escamas, que têm função de proteger as plantas de excessivas luminosidade e proporcionar absorção de água e nutrientes da atmosfera em ambientes nos quais as raízes são prioritariamente fixadoras (Benzing et al., 1976). Estas respondem bem ao processo de aclimatização, tendo uma taxa elevada de sobrevivência, porém leva um longo tempo neste processo, fator que pode ser melhorado (SOUZA et al., 2009).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre (CPAFAC) da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária (Embrapa Acre). As sementes de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. utilizadas para os experimentos foram provenientes de frutos em estágio maduro (Figura 2) coletados em agosto de 2012 de plantas localizadas na rodovia AC- 90 (Estrada Transacreana), Km10 (10°01'16.9" S e 67°55'26.6"W).



**Figura 2** - *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. A- Indivíduos adultos em seu habitat natural; B- Inflorescência madura; C- Frutos e sementes de *Aechmea setigera*.

No laboratório, os frutos foram armazenadas em geladeiras, em dezembro de 2012 as sementes foram retiradas dos frutos com auxílio de pinça e lavadas com detergente Tween-20<sup>®</sup> e água corrente. Em seguida foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada. A desinfestação das mesmas ocorreu em câmara de fluxo laminar, conforme o protocolo padrão do Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre, as quais foram imersas em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto, depois em solução comercial de hipoclorito de sódio a 2,5 % de cloro ativo, por trinta minutos. Após este tempo, as mesmas foram lavadas quatro vezes em água destilada e autoclavada.

O meio de cultura utilizado para a inoculação das sementes foi o MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>) e ágar (6 g.L<sup>-1</sup>), tendo o pH ajustado a 5,8 antes da autoclavagem. Os mesmos foram autoclavados por 18 minutos a 1,1Kg/cm<sup>2</sup>, em

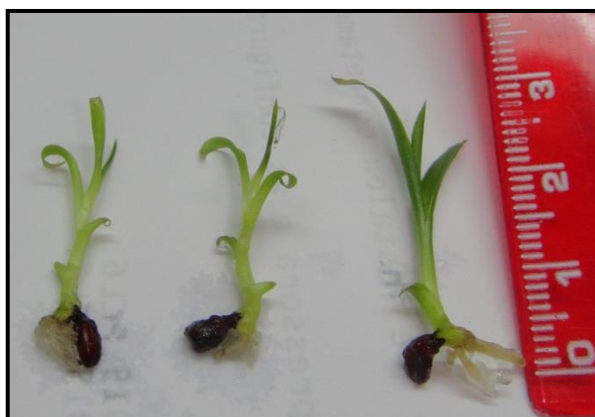
temperatura de 121°C. A composição e concentração de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e inositol do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Composição e concentração dos constituintes do meio de cultura formulado por Murashige & Skoog (1962).

<b>Meio MS (1962)</b>	
<b>Macronutrientes</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1 650
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1 900
<b>CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O</b>	440
<b>MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O</b>	370
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170
<b>Micronutrientes</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
<b>MnSO. 4H<sub>2</sub>O</b>	22,3
<b>ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O</b>	8,6
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6,3
<b>KI</b>	0,83
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O</b>	0,25
<b>CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O</b>	0,025
<b>CoCL<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O</b>	0,025
<b>FeSO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O</b>	37,3
<b>NaEDTA. 2H<sub>2</sub>O</b>	27,8
<b>Vitaminas</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
<b>Glicina</b>	2
<b>Ácido nicotínico</b>	0,5
<b>Piridoxina. Hcl</b>	0,5
<b>Tiamina. Hcl</b>	0,1
<b>Mio- Inositol</b>	100

As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob radiação de  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz branca do tipo luz do dia (fluorescentes).

Plântulas germinadas e desenvolvidas após 18 dias de cultivo *in vitro*, medindo acima de 2 cm (Figura 3), foram utilizadas para o experimento de multiplicação *in vitro*. Após 48 dias de cultivo *in vitro*, as plântulas germinadas foram utilizadas para o experimento de enraizamento *in vitro*.



**Figura 3** - Plântulas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. germinadas *in vitro*, após 18 dias de cultivo.

### 3.1 Multiplicação *in vitro* de *Aechmea setigera*

#### 3.1.1 Efeito de diferentes citocininas (BAP, 2-iP e CIN) e concentrações (0; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,7 $\mu\text{M}$ ) sobre a multiplicação *in vitro*

Após 18 dias da germinação *in vitro*, plântulas medindo acima de 2 cm foram seccionadas na base para retirada das raízes. Em seguida, os brotos foram inoculados em frascos de vidro (250 mL) contendo 30 mL de meio de cultura MS acrescido de BAP (6-Benzilaminopurina), 2-iP (Isopenteniladenina) e CIN (6-furfurilaminopurina) em diferentes concentrações (0; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,7  $\mu\text{M}$ ).

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 5 (Citocinina x Concentração), totalizando 15 tratamentos (Tabela 2), com cinco repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental constituída por um frasco com quatro explantes.

**Tabela 2** - Esquema dos tratamentos de diferentes tipos e concentrações de citocininas usados na multiplicação de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. em meio de cultura MS semissólido.

Concentração ( $\mu$ M)	Citocinina		
	BAP	2-iP	CIN
0	T1	T6	T11
2,2	T2	T7	T12
4,4	T3	T8	T13
8,8	T4	T9	T14
17,7	T5	T10	T16

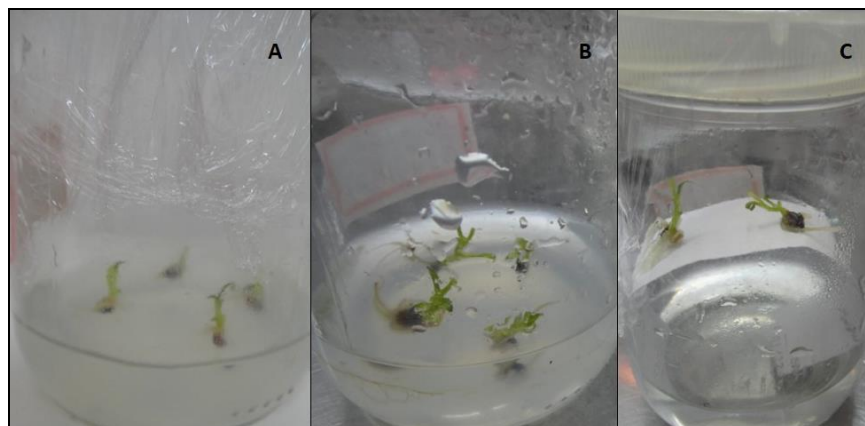
Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados número médio de brotações por explante (NBE); comprimento médio das brotações (CB) com auxílio de paquímetro (MESSEN, 150mm); e número médio de folhas por brotação (NF). Os dados número de brotos e número de folhas foram transformados em  $(x+0,5)^{0,5}$ .

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de separação de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa Assisat 7.6 beta (SILVA, F.A.S.E., 2009).

### 3.1.2 Efeito de sistemas de cultivo *in vitro* sobre a multiplicação

Após 18 dias da germinação *in vitro* as plântulas obtidas, medindo acima de 2 cm, foram seccionadas na base para retirada das raízes. Em seguida, os brotos foram inoculados em meio

MS acrescido de BAP (6-Benzilaminopurina) em diferentes concentrações (0; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,7  $\mu\text{M}$ ), e submetidos a três sistemas de cultivo: semissólido, dupla-fase e líquido estacionário com ponte de papel (Figura 4).



**Figura 4** - Plântulas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. submetidas a diferentes sistemas de cultivo. **A**- Sistemas semissólido; **B**- Sistema dupla-fase; **C**- Sistema líquido estacionário sobre ponte de papel.

Para o sistema de cultivo semissólido, os brotos foram inoculados em frascos de vidro contendo 30 mL de meio de cultura semissólido (contendo 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar), conforme descrito anteriormente. No sistema de cultivo dupla-fase, os brotos foram inoculados em frascos de vidro contendo 20 mL de meio de cultura semissólido e 10 mL de meio de cultura líquido, com as mesmas composições, conforme descrito anteriormente.

Para o sistema de cultivo em meio líquido estacionário, os brotos foram inoculados em frascos de vidro contendo 30 mL de meio de cultura líquido (conforme descrito anteriormente) sobre ponte de papel, de modo que os brotos não ficassem imersos no meio de cultura.

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 5 (tipos de sistema de cultivo x concentrações de BAP), totalizando 15 tratamentos (conforme Tabela 3), com cinco repetições por tratamento, sendo que para o sistema semissólido e dupla-fase cada unidade experimental foi constituída de quatro explantes por frasco; e para o líquido estacionário sob ponte de papel, de dois explantes por frasco.

**Tabela 3** - Esquema de tratamentos dos sistemas de cultivo *in vitro* e diferentes concentrações da citocinina BAP (6-Benzilaminopurina) usados na multiplicação de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. em meio MS semissólido, dupla-fase e líquido estacionário com ponte de papel.

Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )	Semissólido	Dupla-fase	Líquido estacionário sob ponte de papel
0	T1	T6	T11
2,2	T2	T7	T12
4,4	T3	T8	T13
8,8	T4	T9	T14
17,7	T5	T10	T15

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados número médio de brotações por explante (NBE); comprimento médio das brotações (CB) com auxílio de paquímetro (MESSEN, 150mm); e número médio de folhas por brotação (NF). Os dados número de brotos e número de folhas foram transformados em  $(x+0,5)^{0,5}$ .

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de separação de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa Assistat 7.6 beta (SILVA, F.A.S.E., 2009).

### 3.2 Enraizamento *in vitro* de *A. setigera*

Brotos medindo acima de 2,0 cm de altura, oriundos do experimento de multiplicação *in vitro* sobre o efeito de diferentes citocininas em diferentes concentrações, foram selecionados, removidos e inoculados assepticamente em frascos de vidro contendo 30 mL de meio de cultura MS, suplementados com sacarose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e solidificados com ágar ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ), em diferentes concentrações das auxinas ácido 3-indolacético (AIA) e ácido indolbutírico (AIB) (0; 2,46; 4,92;

9,84  $\mu\text{M}$ ), (Tabela 4). O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,8 \pm 0,2$  antes da adição do ágar e da autoclavagem, realizada por 15 minutos a 121 °C e 1,3 atm de pressão.

As culturas foram mantidas por 30 dias em sala de crescimento à temperatura controlada de  $25 \pm 2$  °C, dispondo de lâmpadas fluorescentes e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , expostas a fotoperíodo de 16 horas de luz.

**Tabela 4** - Esquema dos tratamentos e das diferentes concentrações das auxinas AIA (ácido 3-indolacético) e AIB (ácido indolbutírico) usados no enraizamento *in vitro* de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult..

Concentrações ( $\mu\text{M}$ )	AIA	AIB
0	T1	T5
2,4	T2	T6
4,9	T3	T7
9,8	T4	T8

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (tipos de auxina x concentrações), com cinco repetições por tratamento, e cada unidade experimental foi constituída de um frasco com quatro explantes.

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados número médio de raízes por explante (NRE), comprimento médio de raízes (CR), comprimento médio das brotações (CB) com auxílio de paquímetro (MESSEN, 150mm); e número médio de folhas por brotação (NF). Os dados de NRE e NF foram transformados em  $(x+0,5)^{0,5}$ .

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de separação de medias de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa Assistat 7.6 beta (SILVA, F.A.S.E., 2009).



### 3.3 Aclimatização sob diferentes níveis de sombreamento

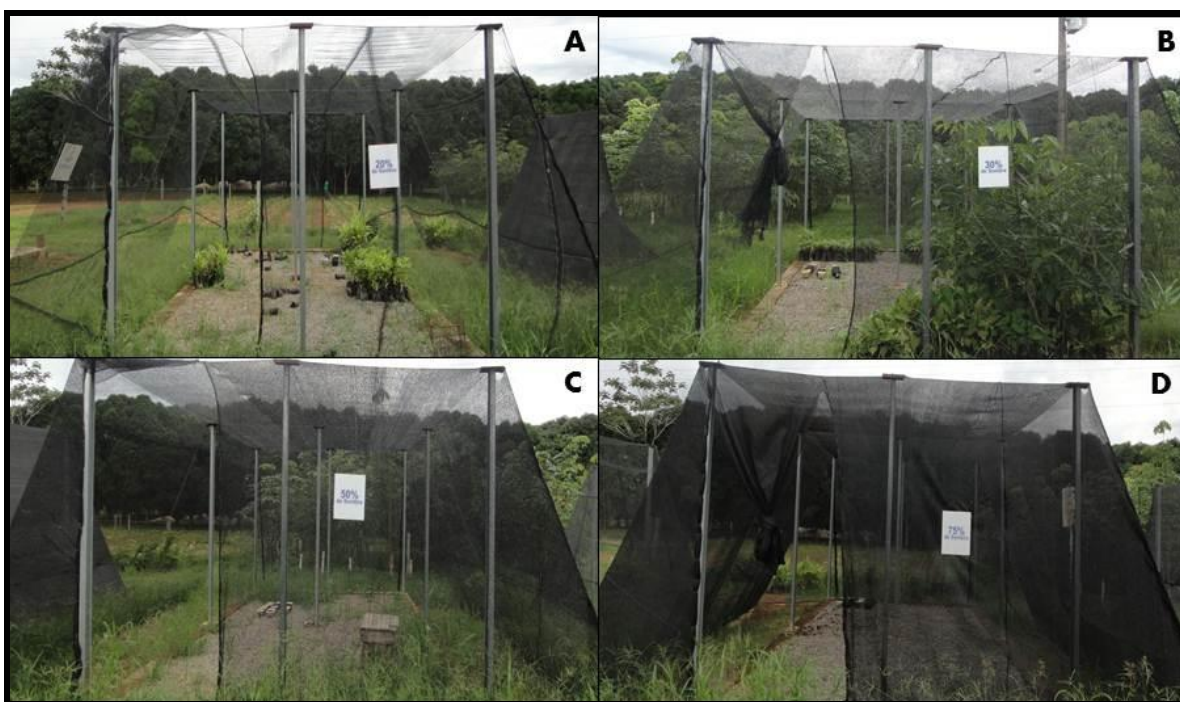
As plântulas utilizadas para aclimatização sob diferentes níveis de sombreamento foram oriundas do experimento de enraizamento *in vitro*, descrito anteriormente (Item 3.2). Plântulas foram selecionadas uniformemente com média de 4 cm de comprimento da parte aérea (Figura 5), lavadas em água corrente para retirada do meio de cultura, e transferidas para vasos plásticos.

Para a montagem do experimento foram utilizados vasos de plástico quadrados de 9 cm<sup>3</sup> contendo substrato comercial Plantmax Florestal<sup>®</sup>. O experimento foi instalado em viveiro situado no campo experimental da Embrapa Acre, no município de Rio Branco/AC.



**Figura 5** - Plântula de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. propagada *in vitro* e utilizada para a aclimatização sob diferentes níveis de sombreamento.

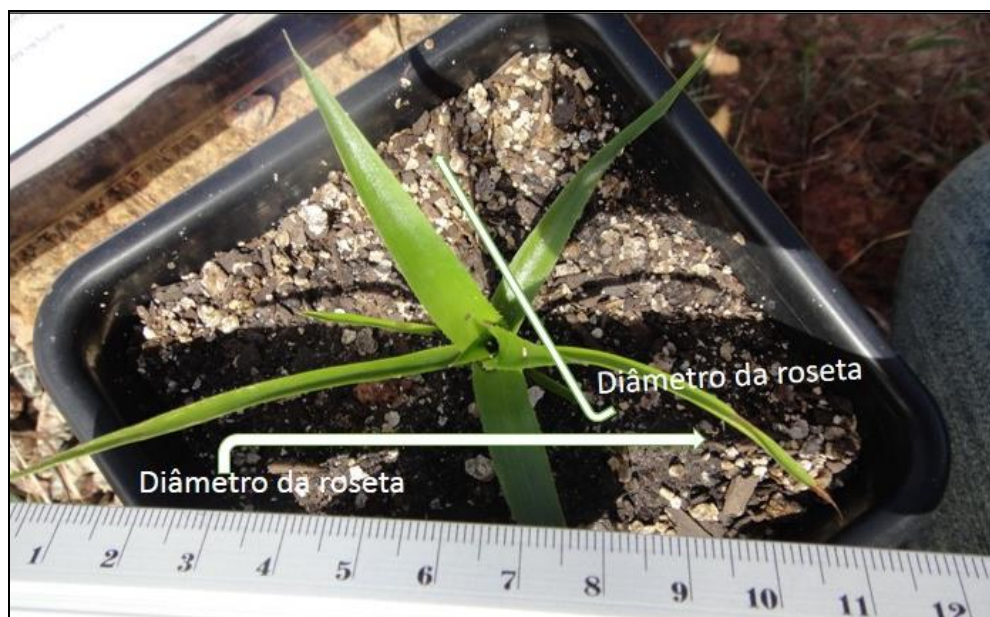
No viveiro foram selecionados quatro ambientes protegidos, modelo arco Pampeana, com diferentes coberturas de tela tipo Sombrites<sup>®</sup>, com os seguintes níveis de sombreamento: 20%, 30%, 50% e 75% (Figura 6).



**Figura 6** - Ambientes protegidos em viveiro, modelo arco Pampeana. **A**- Sombrites com 20% de sombreamento; **B**- Sombrites com 30% de sombreamento; **C**- Sombrites com 50% de sombreamento; **D**- Sombrites com 75% de sombreamento.

As plantas mantidas no viveiro foram adubadas a cada 15 dias com o fertilizante foliar YOGEN 2, composto de Mg: 0,5%; Mo: 0,02%; Cu: 0,05%; Zn: 0,1%; B: 0,02%; Mn: 0,1%; N: 30%; P: 10%; K: 10%), concentração de 3g. L<sup>-1</sup> de água. O fertilizante foi aplicado com o auxílio de um pulverizador costal.

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, constituído de 16 plantas por tratamento, cada qual em um vaso. Após 30, 60 e 90 dias de cultivo foi avaliado a porcentagem de sobrevivência das plantas, número de folhas, diâmetro da roseta 1 e diâmetro da roseta 2, estas variáveis foram analisadas devido as bromélias possuírem formato de roseta e suas folhas terem habilidade de absorver água e nutrientes, fatores que ajuda na adaptação a economia de água destas plantas. Sendo considerado diâmetro da roseta a medição entre as extremidades finais das folhas que apresentavam a maior distância entre si, por meio de régua graduada em centímetros. Para esta bromélia tem-se dois diâmetros de roseta (Figura 7).



**Figura 7** – Medição dos diâmetros da roseta de plantas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. aclimatizadas.

Com 90 dias de aclimatização também foi avaliado o comprimento da maior raiz, massa fresca e seca das plantas. Os dados número de folhas foram transformados em  $(x+0,5)^{0,5}$ .

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de separação de medias de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa Assistat 7.6 beta (SILVA, F.A.S.E., 2009).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Multiplicação *in vitro* de *Aechmea setigera*

#### 4.1.1 Efeito de diferentes citocininas (BAP, 2-iP e CIN) e concentrações (0; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,7 $\mu\text{M}$ ) sobre a multiplicação *in vitro*

As variáveis em estudo, expressas por número de brotos (NB), comprimento do broto (CB) e número de folhas (NF) de *Aechmea setigera*, após 30 dias em meio de multiplicação demonstraram diferenças significativas no número de brotos e comprimento dos brotos (Tabela 5).

**Tabela 5** - Respostas morfológicas de *Aechmea setigera* sob efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

C ( $\mu\text{M}$ )	Número de Brotos			Comprimento do Broto (mm)			Número de Folhas		
	BAP	2-Ip	CIN	BAP	2-iP	CIN	BAP	2-iP	CIN
0	1,22 aB	1,22 aB	1,22 aB	43,9 aA	43,9 aA	43,9 aA	2,30 aA	2,30 aA	2,30 aA
2,2	1,75 aA	1,51 bB	1,50 bB	28,4 aB	32,1 aB	33,7 aB	2,46 aA	2,46 aA	2,44 aA
4,4	1,58 bA	1,70 aA	1,51 bB	26,1 aB	33,3 aB	27,3 aB	2,36 aA	2,66 aA	2,64 aA
8,8	1,72 aA	1,44 bB	1,64 aA	35,6 aB	29,4 aB	29,7 aB	2,68 aA	2,58 aA	2,50 aA
17,7	1,44 bB	1,99 aA	1,75 aA	40,4 aA	32,5 bB	30,0 bB	2,21 aA	3,16 aA	2,53 aA
CV (%)		15,95			32,70			15,20	
Média	1,54	1,57	1,52	34,88	34,24	32,92	2,39	2,63	2,48

Nota: As médias seguidas pela mesma letra minúscula (comparadas na linha) e pela mesma letra maiúscula (comparadas na coluna) não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

A utilização da citocinina BAP nas concentrações de 2,2; 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$  não diferiram estatisticamente e estimularam a formação do maior número de brotos. A ausência de BAP, bem como altas concentrações (17,7  $\mu\text{M}$ ), proporcionaram a formação do menor número de brotações, provavelmente tiveram efeito inibitório. Com a aplicação exógena de 2-iP, o maior número de brotações foi observado nas concentrações de 4,4 e 17,7  $\mu\text{M}$ . Com o uso de CIN, as concentrações de 8,8 e 17,7  $\mu\text{M}$  induziram a formação do maior número de brotos. Dentre os reguladores de crescimento avaliados, o BAP foi o mais eficiente em menor concentração.

Em estudos de multiplicação *in vitro* de *Vriesea scalaris*, a utilização do BAP promoveu os melhores resultados com relação ao número de brotos do que a CIN, onde aos trinta dias de cultura foi observada a regeneração das brotações (SILVA et al., 2009). Na micropropagação do abacaxizeiro ornamental, a utilização de BAP em baixas concentrações promoveu o maior número de brotações (DIAS et al., 2011). Santa-Rosa et al. (2013), estudando *Aechmea blanchetiana* verificaram que o BAP, independentemente da concentração, mostrou os melhores resultados para o número médio de brotos. Já para *Aechmea distichantha*, o mesmo autor observou que o BAP na concentração 2,2  $\mu\text{M}$  proporcionou o maior número de brotos. Silva et al. (2012) obtiveram o maior número de brotos para *Nidularium procerum* e *N. innocentii* utilizando BAP na concentração de 4  $\mu\text{M}$  e 8  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Em trabalhos de multiplicação *in vitro*, o BAP tem mostrado mais eficiência entre as citocininas utilizadas, por induzir o maior número de brotos e elevadas taxas de multiplicação em várias espécies de plantas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

O comprimento dos brotos regenerados com a utilização de BAP foi menor nas concentrações de 2,2; 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$ . Na ausência e na maior concentração de BAP (17,7  $\mu\text{M}$ ) o comprimento dos brotos regenerados foram maiores. O uso de 2-iP e de CIN, em todas as concentrações utilizadas, não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si, no entanto apresentaram os menores comprimento de brotos regenerados.

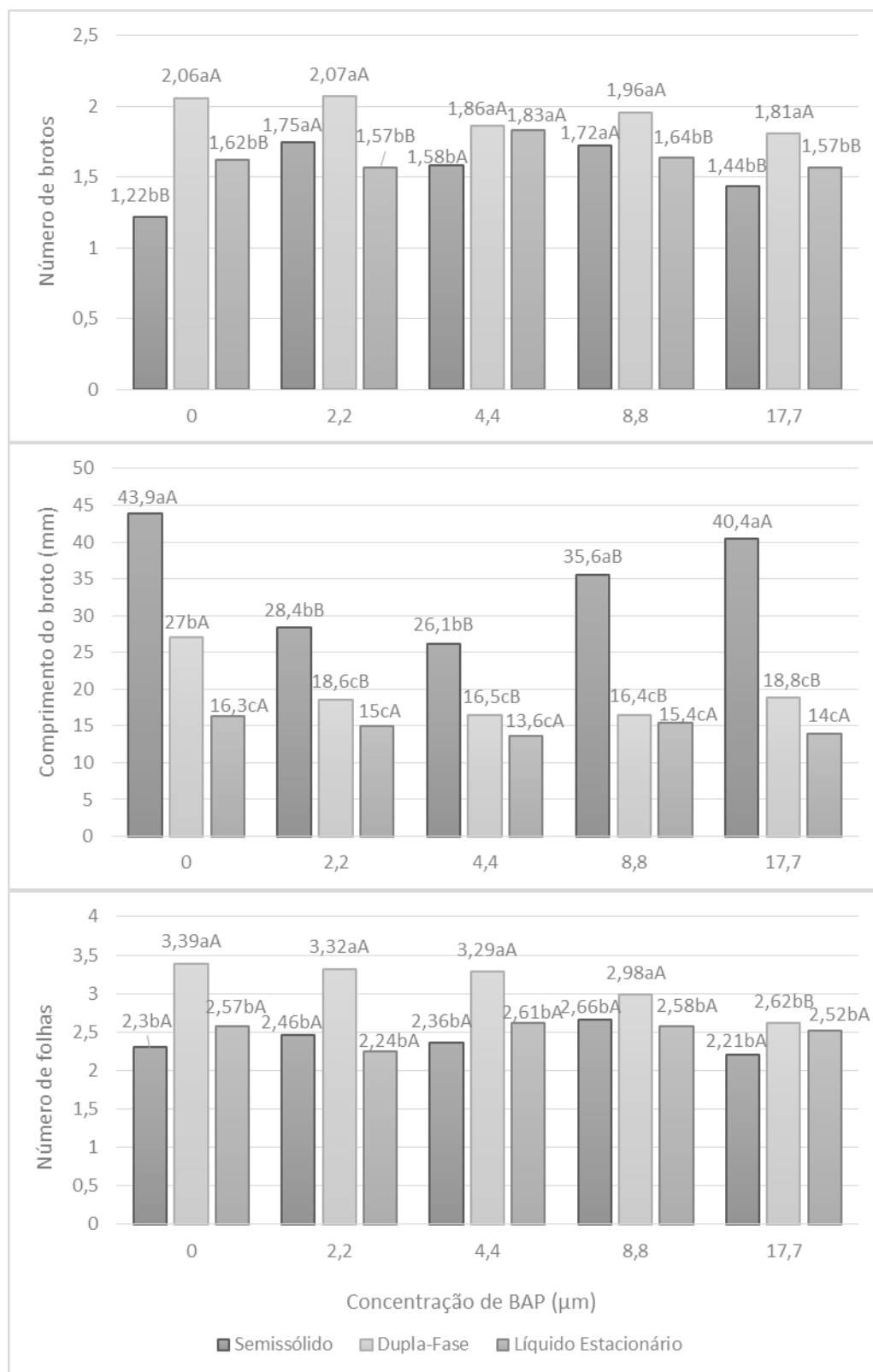
Moreira (2008) verificou que para as *Aechmea fasciata* e *A. miniata* o maior comprimento de brotos ocorreu em meios sem a adição de reguladores vegetais. A ausência do uso de BAP também promoveu o maior comprimento dos brotos regenerados em abacaxizeiro comercial (DIAS et al., 2011). Já para Rocha (2010), o uso de BAP em baixas concentrações na multiplicação de *Aechmea bromelifolia*, *A. distichantha*, *A. multiflora* e *H. catingae* possibilitou os maiores comprimentos nas brotações.

A aplicação exógena de diferentes citocininas (BAP, 2-iP e CIN) em diferentes concentrações não promoveu alteração no número de folhas desenvolvidas nos brotos regenerados (Tabela 5). A ausência de diferença estatística para esta variável também foi observada por Macedo et al. (2003) na micropropagação de abacaxizeiro, em diferentes concentrações de BAP e ANA. Silva (2010) afirmou que o melhor tratamento para o número de folhas de *Aechmea blanchetiana* foi a testemunha, que não apresentava regulador de crescimento, sendo favorável para produção de mudas, pois minimiza o custo da técnica.

Para *Aechmea setigera*, observou-se que nos tratamentos com concentrações 2,2; 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP foram registrados os maiores números de brotos, os quais tiveram os menores comprimentos e o mesmo número de folhas, ou seja, nessas concentrações o investimento metabólico da espécie foi em aumentar o número de brotações.

#### 4.1.2 Efeito de sistemas de cultivo *in vitro* sobre a multiplicação

As variáveis em estudo, expressas por número de brotos (NB), comprimento do broto (CB) e número de folhas (NF) de *Aechmea setigera*, após 30 dias em meio de multiplicação, com diferentes concentrações de BAP e sistemas de cultivo (semissólido, dupla-fase e líquido estacionário sob ponte de papel) foram submetidas à análise de variância e teste de separação de médias e demonstraram diferenças significativas (Figura 8).



**Figura 8** - Respostas morfológicas da multiplicação *in vitro* de *Aechmea setigera* submetida aos sistemas de cultivo semissólido, dupla-fase e líquido estacionário, com o uso de BAP (6-Benzilaminopurina), após 30 dias.

Nota: As médias seguidas pela mesma letra minúscula (compara os sistemas de cultivo em diferentes concentrações de BAP) e pela mesma letra maiúscula (compara um sistema de cultivo em diferentes concentrações de BAP) não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Os maiores números de brotações obtidos em sistema de cultivo semissólido foram 1,75; 1,58 e 1,72 observados nas concentrações 2,2; 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP, respectivamente, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Os brotos regenerados em sistema dupla-fase não apresentaram diferenças estatisticamente significativas com relação às diferentes concentrações de BAP utilizadas, inclusive na ausência do mesmo. No sistema de cultivo em meio líquido estacionário, o maior número de brotos foi observado com o uso de 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP, e nos demais tratamentos os valores foram inferiores e iguais estatisticamente.

De modo geral, a utilização do sistema de cultivo dupla-fase apresentou melhores resultados com relação ao número de brotos regenerados, porém estatisticamente este sistema não diferiu do semissólido quando acrescido de BAP nas concentrações 2,2 e 8,8  $\mu\text{M}$ . O cultivo de brotos em meio líquido estacionário sob ponte de papel mostrou-se inferior em relação aos outros sistemas.

O maior comprimento de broto em sistema semissólido ocorreu em meio isento de BAP e na maior concentração deste (17,7  $\mu\text{M}$ ). O sistema dupla-fase apresentou o melhor comprimento de broto na ausência da citocinina, as outras concentrações não diferiram estatisticamente entre si. Em meio líquido estacionário sob ponte de papel os tratamentos foram inferiores, não apresentando diferenças estatísticas. Para essa variável, quando se compara os três sistemas de cultivo com diferentes concentrações de BAP, o sistema semissólido na ausência e nas concentrações 8,8 e 17,7  $\mu\text{M}$  desta citocinina apresentou-se como o melhor.

Com relação ao número de folhas desenvolvidas, no sistema de cultivo dupla-fase, os maiores números foram registrados nos tratamentos isento de regulador e com concentrações de 2,2, 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP. Entretanto, nos sistemas de cultivo em meio semissólido e líquido estacionário não existiram diferenças estatisticamente significativas. De modo geral, o uso do sistema de cultivo dupla-fase apresentou maior número de folhas em *Aechmea setigera* com o uso da citocinina BAP.



Lima (2009), com a cultura de abacaxizeiros, observou que o sistema de cultivo dupla-fase é superior ao semissólido em relação às variáveis avaliadas, como a taxa de multiplicação, altura de brotações maiores e menores que 0,5 cm e estimativa do número de mudas a serem produzidas em razão do tempo de multiplicação, e a utilização de BAP é necessária no sistema dupla-fase para a indução de múltiplas brotações *in vitro* de variedades de abacaxizeiro, já para o presente trabalho foi observado que não é necessário a utilização de BAP para regeneração de brotos de *Aechmea setigera* em sistema dupla-fase.

Moraes et al. (2004), em seu trabalho de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Pyrus calleryana* D-6, concluíram que o sistema de cultivo dupla-fase é muito efetivo na multiplicação desta espécie de pereira, promovendo a qualidade e quantidade das brotações *in vitro*. A alta taxa de multiplicação e o maior comprimento dos brotos (33 mm) foram obtidos em meio MS contendo BAP (6,7  $\mu\text{M}$ ) e AIB (0,5  $\mu\text{M}$ ), diferentemente do presente trabalho, em que o maior comprimento de brotos ocorreu em meio semissólido sem a adição de BAP.

Na multiplicação de macieira Marubakaido, o meio dupla-fase apresentou-se superior ao semissólido em todos os parâmetros analisados. Os explantes cultivados em dupla-fase formaram as maiores brotações, em maior número (MACHADO et al., 2004). Os resultados deste trabalho mostram que o maior número de brotos também foi obtido em meio dupla-fase, porém o maior comprimento ocorreu em meio semissólido.

Mengarda et al. (2009), estudando o estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae, avaliaram o desenvolvimento dos brotos em meio MS semissólido, líquido estático, líquido sob agitação e líquido estático com ponte de papel filtro, contendo BAP e ANA. Estes autores concluíram que o meio líquido estático mostrou-se o mais adequado para as espécies estudadas, enquanto que o meio semissólido e líquido estático sob ponte de papel teve a menor média de brotações, não apresentando diferença significativa entre eles. Barboza et al. (2009) obtiveram o maior número de brotos em meio líquido na micropropagação de abacaxizeiro cv. Pérola, estabelecendo um protocolo eficiente no cultivo *in vitro* desta espécie em meio MS líquido, acrescido de 0,63  $\mu\text{M}$  de ANA e 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP. Estes autores não obtiveram bons resultados com o meio líquido estático sob ponte de papel, resultados que concordam com este estudo.

De La Vinã et al. (2001) afirmaram que semelhantes ao meio líquido, o dupla-fase proporciona uma maior quantidade de nutrientes facilmente utilizáveis pelos explantes cultivados

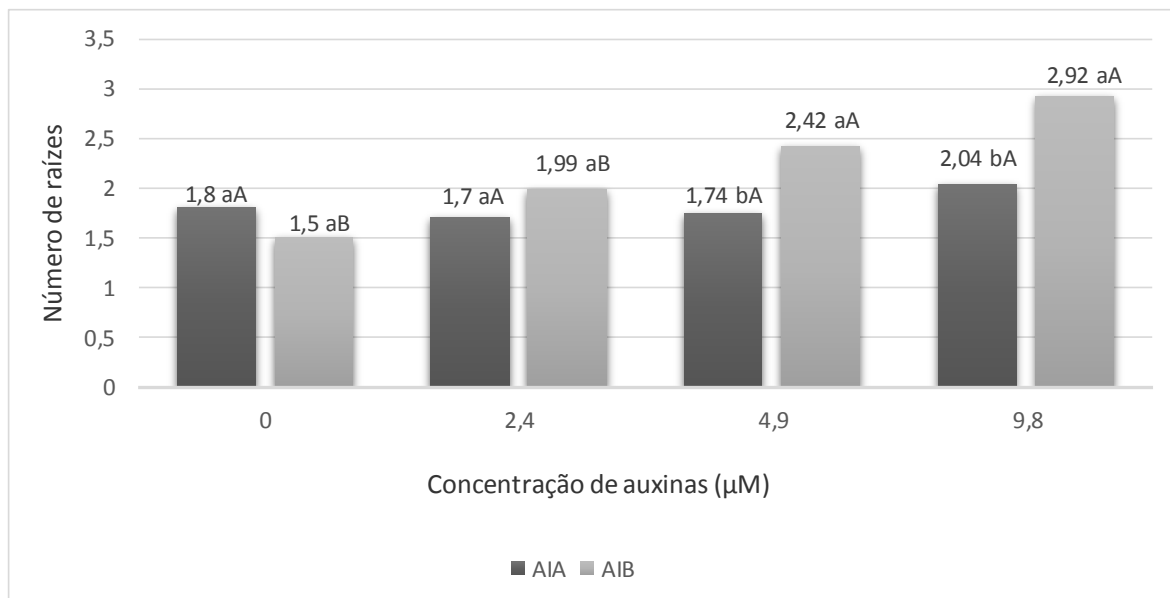
*in vitro*, pois não existe qualquer barreira física presente no meio, o que facilita o aumento da disponibilidade dos nutrientes aos explantes. Pereira et al. (2012) concluíram que o uso deste sistema resulta na diminuição de gastos com gelificantes para o meio de crescimento, e redução da necessidade de mão de obra durante a multiplicação. Esses mesmos autores afirmam que o meio dupla-fase pode ser um método simples e eficiente para a propagação em larga escala de uma variedade de cultivares de abacaxi, e pode ser aplicado a outras culturas, como a bromélia, que apresenta também características ornamentais.

Conforme o presente trabalho, o uso do meio dupla-fase para a bromeliaceae *Aechmea setigera* promoveu o maior número de brotações e folhas, entretanto, o meio semissólido foi mais eficiente para o comprimento dos brotos, não sendo necessária a utilização do BAP em ambos os meios de cultivo.

#### **4.2 Enraizamento *in vitro* de *A. setigera***

Dentre as variáveis em estudo, expressas por número médio de raízes por explante (NR), comprimento médio de raízes (CR), comprimento médio das brotações (CB), e número médio de folhas por brotação (NF), demonstraram diferenças significativas para as variáveis NRE e CB.

Todos brotos de *A. setigera* submetidos ao enraizamento *in vitro* formaram raízes, e com o uso de AIB, o maior número de raízes foi registrado com as concentrações de 4,9 e 9,8  $\mu\text{M}$ . Com o uso de AIA, o número de raízes adventícias regeneradas foi igual estatisticamente, independente da concentração, inclusive na ausência do mesmo (Figura 9).



**Figura 9** - Análise do número de raízes de brotos de *A. setigera* em meio de enraizamento *in vitro*, após 30 dias de cultivo.

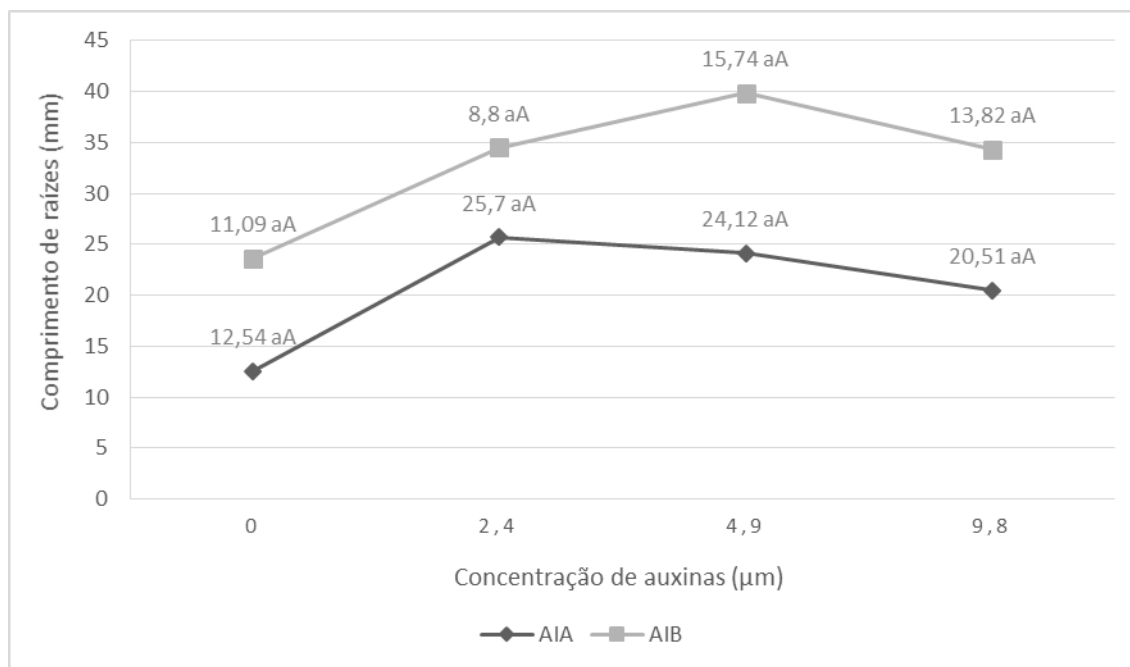
Nota: As médias seguidas pela mesma letra minúscula (compara as auxinas em diferentes concentrações) e pela mesma letra maiúscula (compara uma auxina em diferentes concentrações) não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Tais resultados indicam que os níveis endógenos de AIA são suficientes para a indução de rizogênese em *Aechmea setigera*. De modo geral, o uso de AIB é mais eficiente do que AIA para *A. setigera*. Silva et al. (2009) verificaram que para *Vriesea scalaris*, a ausência de regulador também induz a rizogênese, porém o uso de AIB não promoveu o aumento do número de raízes regeneradas. Lima (2009), estudando o enraizamento *in vitro* de abacaxizeiros multiplicados *in vitro*, concluiu que não é necessária a utilização de AIB para induzir a produção de raízes.

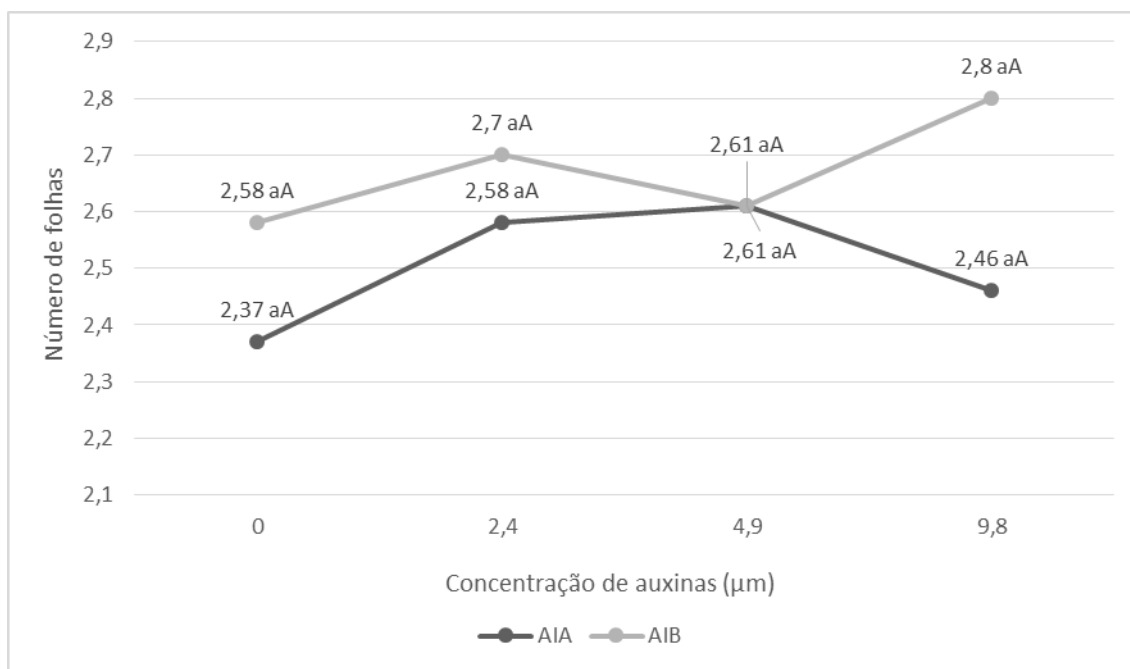
Lima et al. (2012) verificaram que o AIB nas concentrações 0, 00; 1,11 e 2,22 μM não favoreceu a rizogênese *in vitro* da bromélia *Orthophytum mucugensis* e o aumento da sua concentração associado à presença do carvão ativado teve efeito negativo sobre o comprimento das raízes, reduzindo-as significativamente de tamanho.

Dias et al. (2010), trabalhando com ananás-do-campo, concluíram que esta espécie pode ser enraizada *ex vitro* sem a imersão em solução de AIB, eliminando a etapa de enraizamento *in vitro*.

A utilização das auxinas AIB e AIA, em diferentes concentrações, não promoveram alterações no comprimento médio de raízes (Figura 10) e no número de folhas regeneradas *in vitro* de *Aechmea setigera* (Figura 11).



**Figura 10** - Análise da variável comprimento das raízes de *A. setigera* em meio de enraizamento *in vitro*, após 30 dias de cultivo.

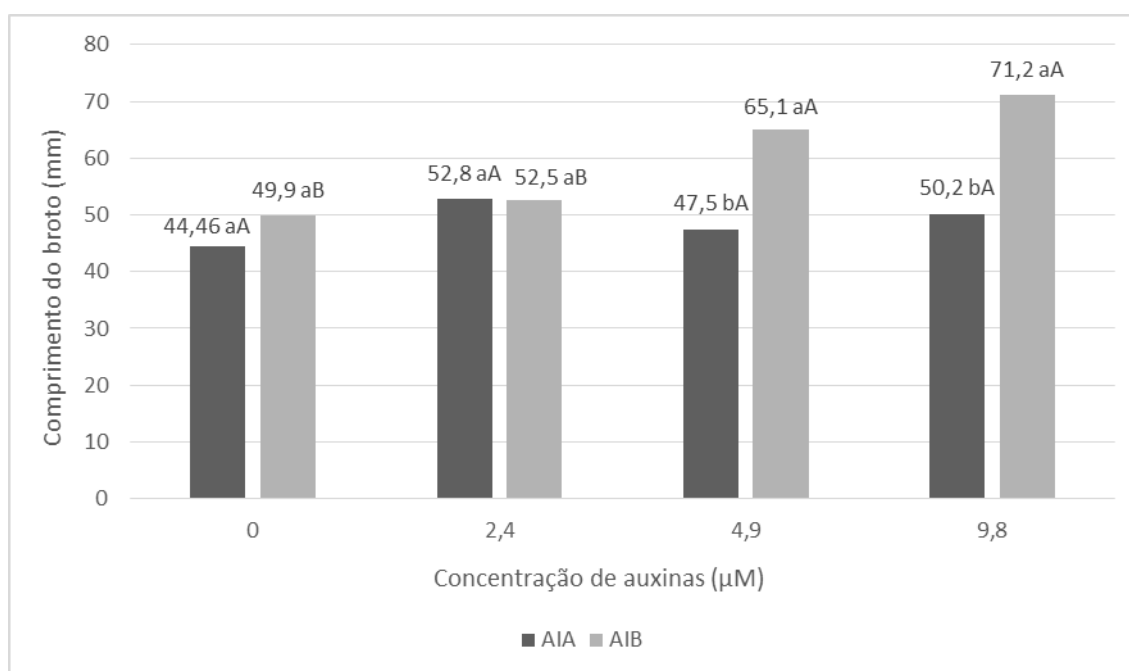


**Figura 11** - Análise da variável número de folhas por brotações de *A. setigera* em meio de enraizamento *in vitro*, após 30 dias de cultivo.

Nota: As médias seguidas pela mesma letra minúscula (compara as auxinas em diferentes concentrações) e pela mesma letra maiúscula (compara uma auxina em diferentes concentrações) não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

A utilização de AIA em culturas de *A. setigera* não influenciou o comprimento das brotações (Figura 12), e também não influenciou o número de raízes regeneradas (Figura 9).

Entretanto, com o uso de AIB, o comprimento dos brotos (Figura 12) foi maior nas concentrações de 4,9 e 9,8  $\mu\text{M}$ , e também o número de raízes adventícias regeneradas. Nesse sentido, observa-se que em *A. setigera*, o maior número de raízes regeneradas influenciou no comprimento dos brotos, evidenciando que o crescimento da parte aérea no cultivo *in vitro* depende do número de raízes.



**Figura 12** - Comprimento médio de brotações de *A. setigera* regeneradas *in vitro*, após 30 dias de cultivo na presença de auxinas em diferentes concentrações.

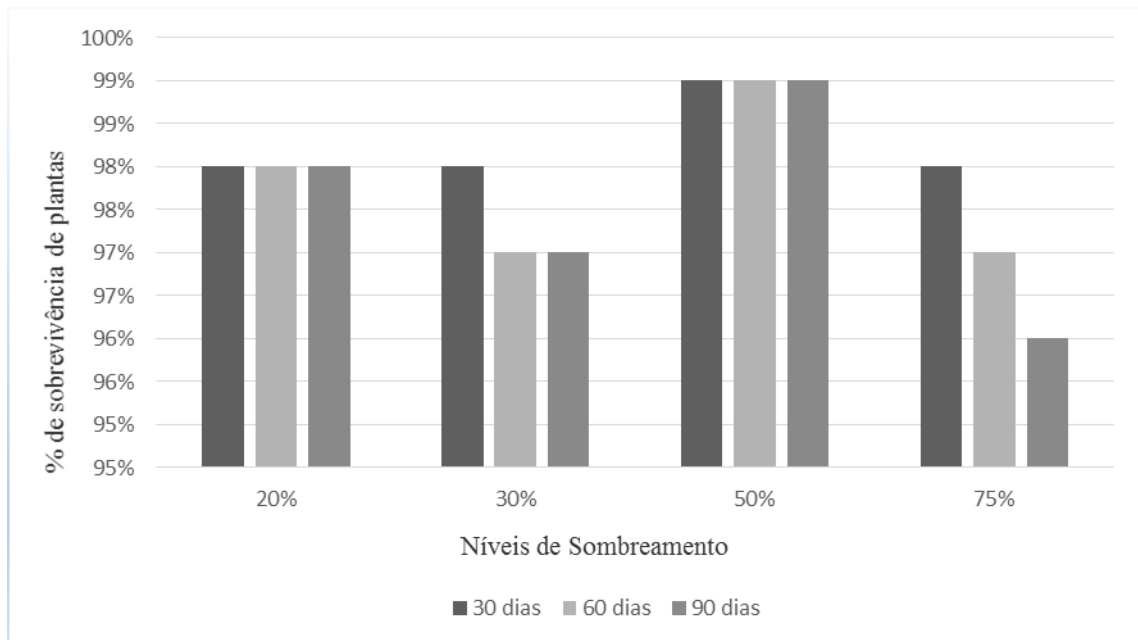
Nota: As médias seguidas pela mesma letra minúscula (compara as auxinas em diferentes concentrações) e pela mesma letra maiúscula (compara uma auxina em diferentes concentrações) não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com Ayoama et al. (2012), a presença e o grau de desenvolvimento das raízes são fatores limitantes para o processo de aclimatização, já que as plântulas irão depender da capacidade de absorção para sobreviver a esta nova condição.

### **4.3 Aclimatização sob diferentes níveis de sombreamento**

As mudas micropropagadas de *A. setigera* foram aclimatizadas sob diferentes níveis de sombreamento, e após 30, 60 e 90 dias de aclimatização foram submetidas à análise de variância. As variáveis em estudo foram a porcentagem de sobrevivência, número de folhas e diâmetro da roseta 1 e 2. Aos 90 dias de aclimatização houve avaliação pelo método destrutivo. As variáveis analisadas foram comprimento médio da raiz, massa fresca e massa seca. Às análises de variância e teste de separação de médias demonstraram diferença significativa para a variável diâmetro da roseta 2.

Aos 30 dias de aclimatização, as plantas que estavam em telas de 20, 30 e 75% de sombra tiveram uma taxa de 98% de sobrevivência, aquelas submetidas a 50% de sombra, obtiveram 99% de sobrevivência. Com 60 e 90 dias aclimatizadas, as plantas que se encontravam com 20 e 50% de sombra não apresentaram morte, enquanto que as que estavam em 30 e 75% apresentaram perda (Figura 13), não diferindo significativamente entre si nos dias de avaliação.



**Figura 13** - Porcentagem de sobrevivência de plantas aclimatizadas sob diferentes níveis de sombreamento (20, 30, 50 e 75%) aos 30, 60 e 90 dias.

Rodrigues et al. (2005) verificaram uma interação entre o tipo de substrato (areia lavada, Vermiculita e Plantmax<sup>®</sup> Horticultura) e o nível de sombreamento (pleno sol, 30, 40, 50, 50, 70 e 80%) na sobrevivência de mudas micropropagadas de *Heliconia bihai*. Os autores obtiveram 95% de sobrevivência em mudas micropropagadas de heliconia em areia lavada e Plantmax<sup>®</sup> à 50% de sombreamento. As plantas que se encontravam à 70% e 80% de sombreamento no substrato areia lavada tiveram 94,15% e 95% de sobrevivência, respectivamente. Aquelas que estavam abaixo de 50% de sombreamento a taxa de sobrevivência foi inferior a 27,50%, e as que estavam em pleno sol tiveram zero de sobrevivência em todos os substratos testados.

Os resultados obtidos por Rodrigues et al. (2005) assemelha-se aos encontrados por este trabalho, devido as mudas de *A. setigera* apresentarem uma taxa ótima em ambiente de 50% de sombreamento.

As variáveis número de folhas e diâmetro da roseta 1 não apresentaram diferença estatística para os diferentes níveis de sombreamento e tempos de aclimatização. Nos 30, 60 e 90 dias de avaliação as plantas em 20% de sombreamento apresentaram números de folhas 2,3; 2,4 e 2,5, respectivamente. Aquelas que encontravam-se em 30% de sombra tiveram 2,4; 2,4 e 2,2 de folhas, respectivamente; em 50% de sombra obtiveram 2,3; 2,4 e 2,6 número de folhas,

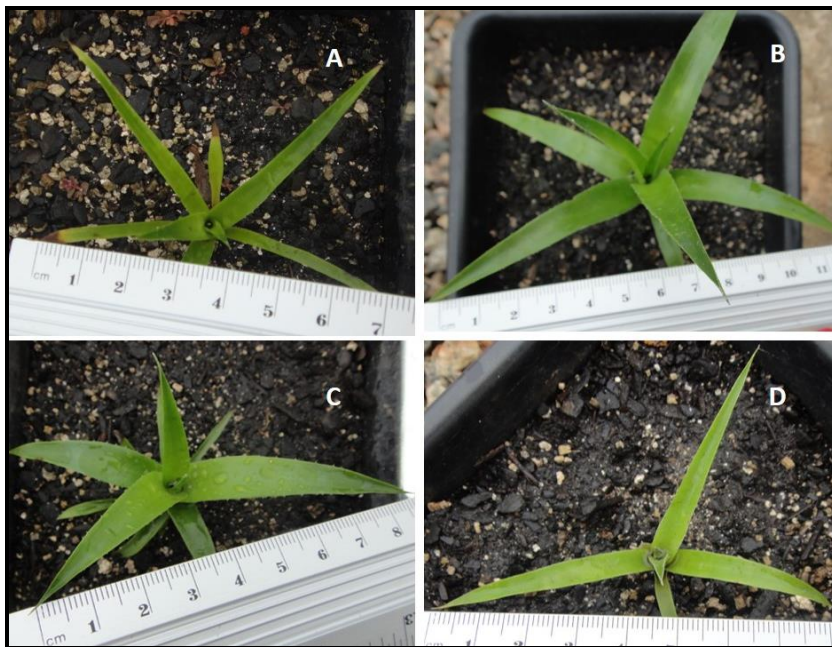
respectivamente; em ambiente com 75% de sombra tiveram 2,2 números de folhas em todos os tempos de avaliação. Para o diâmetro da roseta 1 as plantas de *A. setigera* micropropagadas apresentaram os seguintes valores nos 30, 60 e 90 dias de avaliação nos níveis de sombreamento testados. Em 20% de sombra obtiveram 5,1; 5,2 e 6,1 cm de diâmetro, respectivamente; aos 30% de sombra 5,7; 6,2 e 6,6 cm, respectivamente; aos 50% de sombra 3,6; 5,1 e 8,2 cm, respectivamente; e no sombreamento de 75% apresentaram 4,3; 4,4 e 5,0 cm de diâmetro, respectivamente. Apesar de não apresentarem diferenças significativas, pode ser observado, que aos 90 dias de avaliação as plantas apresentavam-se em números maiores centímetros de diâmetro da roseta 1, em todos os sombreamentos testados.

Já para a variável diâmetro da roseta 2, apresentou-se diferença significativa estatisticamente. As plantas aos 30 dias de avaliação, que se encontravam em 30% de sombra apresentaram o maior diâmetro da roseta 2 (5,4 cm), os demais sombreamentos não diferiram entre si, apresentando os seguintes valores 3,4; 2,8 e 3,2 cm em ambientes de 20%, 50% e 75% de sombra, respectivamente. Aos 60 e 90 dias, em todos os níveis testados, as plantas não diferiram entre si. Apresentando em 20% de sombra 4,8 e 6,1 cm, respectivamente, em 30% de sombra 4,5 e 5,2 cm, respectivamente; no sombreamento de 50% tiveram 3,5 e 5,6 cm, respectivamente, em 75% de sombra apresentaram 3,5 e 3,4 cm de diâmetro da roseta 2, respectivamente.

As variáveis comprimento da raiz, massa fresca e massa seca, analisadas aos 90 dias de aclimatização não apresentaram diferença significativa para os níveis de sombreamento testados. Aos 20, 30, 50 e 75% de sombra apresentaram os seguintes valores para o comprimento da raiz, 8,76; 8,59; 12,42 e 10,11 cm, respectivamente, para massa fresca 2,33; 2,01; 3,53 e 2,86 g, respectivamente, e massa seca 0,62; 0,55; 0,92 e 0,71 g.

A figura 14 mostra as diferenças visualizadas das plantas de *A. setigera*, nos diferentes níveis de sombreamento. Visualmente apresentaram um maior vigor em ambientes de 30 e 50% de sombra, apresentando-se folhas mais largas, com coloração verde escuro, e formato mais semelhantes as plantas de hábitat natural, essas não tiveram perda de folhas, diferente daquelas plantas que se encontravam em 20 e 75% de sombra, que apresentaram folhas mais estreitas e alongadas, de cor verde-amarelado com oxidações nas pontas, apresentando perda de suas folhas.





**Figura 14** - Plantas de *A. setigera* aos 60 dias de aclimatização sob diferentes níveis de sombreamento. **A**- 20% de sombra; **B**- 30% de sombra; **C**- 50% de sombra e **D**- 75% de sombra.

Na avaliação morfoanatômica de *Aechmea lindenii* sob distintas condições ambientais, Voltolini e Santos (2011) obtiveram maior expansão foliar, decorrente do alongamento da lâmina em ambientes de baixa irradiação solar, e maior largura da lâmina e bainha foliares sob alta irradiação.

Rocha (2002), estudando o desenvolvimento de bromélias em ambientes protegidos com diferentes alturas e níveis de sombreamento (18, 40, 60 e 80%), afirma que cada espécie possui um nível de sombreamento adequado ao seu desenvolvimento. Este autor apresentou como resultado que plantas de *Aechmea fasciata* emitiram um maior número de folhas em ambientes com 40% de sombreamento e o maior diâmetro da roseta em ambientes com 60 e 80%, porém estas apresentaram visualmente características mais desejáveis para a espécie em ambientes de 40% de sombreamento, e a *Guzmania lingulata* apresentou o maior número de folhas em telas com 40% de sombreamento, e o maior diâmetro da roseta não diferiu nos ambientes de 40, 60 e 80% de sombreamento. Este autor indicou o ambiente de 40% de sombreamento para as bromélias em estudo.

Rech et al. (2010) estudaram o comportamento de dendróbio borboleta (*Dendrobium phalaenopsis* var. – Orchidaceae), sob diferentes níveis de sombreamento (tela do viveiro, 30, 40, 50 e 70%), e concluíram que as diferentes intensidades luminosas influenciaram na massa fresca dessas plantas, obtendo os maiores resultados e desenvolvimento em tela do viveiro a 30% de sombreamento. Os mesmos autores retratam que o conhecimento das necessidades luminosas de cada espécie a ser cultivada é necessário para que estas sejam fornecidas às plantas através de sombreamento artificial.

## 5 CONCLUSÃO

A multiplicação *in vitro* de *Aechmea setigera* em meio semissólido em diferentes concentrações de citocininas, demonstrou o uso do BAP como a melhor citocinina, este a 2,2; 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$  proporciona o maior número de brotos, porém o maior comprimento ocorre em meio isento deste regulador de crescimento ou quando elevado a maior concentração 17,7  $\mu\text{M}$ . O número de folhas não foi influenciado pelas diferentes concentrações de BAP.

Quando se compara os três sistemas de cultivo (semissólido, dupla-fase e líquido estacionário) sobre as diferentes concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de *Aechmea setigera*, o sistema dupla-fase na ausência ou presença deste regulador de crescimento a 2,2; 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$ , proporciona a maior taxa de multiplicação e o maior número de folhas, não apresentando diferenças significativas para estas concentrações. O semissólido mostra-se melhor para a variável comprimento de broto na ausência ou a 17,7  $\mu\text{M}$  de BAP. O sistema líquido estacionário demonstrou-se inferior em todas as variáveis analisadas.

Para o enraizamento *in vitro* desta espécie torna-se necessário a utilização de 4,9 ou 9,8  $\mu\text{M}$  de AIB, para produção de raízes e de brotos com maior comprimento.

A maior taxa de sobrevivência das mudas nos tempos de aclimatização estudados ocorreu em sombrite com 30 e 50% de sombreamento, estas mudas apresentaram visualmente, plantas de *A. setigera* com características mais vigorosas nesses ambientes.

## 6 REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S.; SINGH, S.K.; JAIN, M.; et al. *In vitro* cloning of female and male Carica papaya through tips of shoots and inflorescences. **Indian J Biotechnol**, v. 3, p. 235–240, 2004.
- ALMEIDA, A.B.W.; SANTANA, G.S.; PINHEIRO, M.R. COSTA, M.A.P.C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 296-300, 2002.
- ALVES, G.M. & GUERRA, M.P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. paludosa from microbuds. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 51, n. 5, p. 202-212, 2001.
- AMARAL, T. L.; JASMIM, J. M.; NAHOUM, P. I.; FREITAS, C. B; SALES, C. S. Adubação nitrogenada e potássica de bromeliáceas cultivadas em fibra de coco e esterco bovino. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 286-289. 2009.
- AOYAMA, E.M.; GONTIJO, A.B.P.L.; FARIA, D.V. Propagação em bromeliaceae: Germinação de sementes e cultivo *in vitro*. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer, v. 8, n. 15; p. 1452- 1471. 2012.
- ARANDA-PERES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. Bromeliads. In: SILVA, J.A.T. da. (org.). Floriculture, **Ornamental and Plant Biotechnology**. 1ª Ed. London, UK: Global Science Books, 2006. v. 4, p. 644-655.
- ATROCH, E.M.A.C.; SOARES, A.M.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de massa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link submetidas a diferentes condições de sombreamentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 4, p. 853 – 862. 2001.
- AUGUSTO, C.S.S.; BIASI, L.A.; TELLES, C.A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 473-476, 2006.
- BANDEIRA, F.S; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; LANI, E.R.G. Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 5, p. 773-781, 2007.
- BARBOZA, S.B.S. C.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A.; COPATI, L.A.; LEDO, A. da. S. Cultivo inicial *in vitro* de gemas axilares de *Ananas comosus* (L.) Merr., em meio líquido/sólido, na presença/ausência de luz. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33. Edição Especial, p. 1832-1836, 2009.
- BARRUETO CID, L.P. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isto? **Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 19, p. 16-21, 2001.
- BELLINTANI, M.C.; LIMA, C.C.; BRITO, A.L.; SANTANA, J.R.F. DORNELLES, A.L.C. Estabelecimento *in vitro* de *Orthopytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias

endêmicas da Chapada Diamantina. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1101-1103, 2007.

BENCKE, M.; DROSTE, A. Otimização da micropropagação de *Vriesea gigantea* Gaudich (Bromeliaceae), uma espécie ameaçada de extinção, nativa do Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Botânica**, v. 59, p. 299-306, 2008.

BENZING, D.H. **Vascular epiphytes: General biology and related biota**. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 370p. 1990.

BENZING, D.H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 690p. 2000.

BENZING, D.H.; HENDERSON, K.; KESSEL, B.; SULAK, J. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. **American Journal of Botany**, v. 63, p. 1009-1014, 1976.

BOMFIM, G.V. do. **Efeitos de lâminas e frequências de irrigação e de tipos e volumes de substrato na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental**. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem). 2006. 167p. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE.

BORGATTO, F.; HAYASHI, T.K. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P.R.; SENA, J.O.A.; KLUGE, R. A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p. 227-253.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa, 1990. p. 37-70.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, 1998. v.1, p. 87-132.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2006. v. 1, p. 87-132.

CAMOLESI, M.R.; FARIA, R. T. de.; NEVES, C.S.V.J.; MARTINS, A.N. Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação *in vitro* da bananeira ‘Maça’. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 255-260, 2010.

CAMOLESI, M.R.; MARTINS, A.N.; SOUZA, L.D de.; SACONI, C.G. Enraizamento *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa sp.*) em diferentes meio de cultivo. **Ciências Agrotecnológicas**, v. 34, n.6, p. 1446-1451, 2010.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnol Lett**, v. 32, p. 1199 - 1205. 2010.

DAL VESCO, L.L. & GUERRA, M.P. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. **Scientia Horticulturae**, v.125, p. 748–755. 2010.

DAL VESCO, L.L.; STEFENON, V.M, WELTER, L.J.; SCHERER, R.F. & GUERRA, M.P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 515-522. 2011.

DALY, D.; SILVEIRA, M. **Primeiro Catálogo da Flora do Acre**, Brasil. Rio Branco, AC: EDUFAC, 555 p. 2008.

DEB, C.R.; IMCHEN, T. An efficient *in vitro* hardening of tissue culture raised plants. **Biotchnology**, v. 9, p. 79 – 83. 2010.

DE LA VINÃ, G.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 229–237, 2001.

DIAS, M.M.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A.G.; SANTOS, V.A. dos.; CUSTODIO, T.N.; COSTA, F.R.S da. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 4, n. 2, p. 29-33, 2010.

FARIA, D.V. **Indução *in vitro* de brotos em *Aechmea ramosa* var. *ramosa* MART. EX SCHULT. F. (BROMELIACEAE)**. Conclusão de curso- Bacharelado em Ciências Biológicas. 2011. 36p. Universidade Federal do Espírito Santos- ES.

FERREIRA, C.A.; PAIVA, P.D.O.; RODRIGUES, T.M.; RAMOS, D.P.; CARVALHO, G. de; PAIVA, R. Desenvolvimento de mudas de Bromélia (*Neoregelia cruenta* (R.Graham) L.B. Smith) cultivadas em diferentes substratos e adubação foliar. **Ciências Agrotecnológicas**, v. 31, n. 3, p. 666-671. 2005.

FONSECA, M.H.P.B.; CARNEIRO, L.A.; ARAÚJO, R.F.G.; BRITO, G.J.M.; COSTA, A.; CROCOMO, O.J.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration from leaf explant of *Neoregelia cruenta* (R.Graham) L.B. Smith, and endemic bromeliaceae species from eastern Brazil. **Plant Cell Tissue And Organ Culture**, v. 55, p. 79-83, 1999.

FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Estabelecimento *in vitro* da ameixa cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 183-185. 2001.

GALVANESE, M.S.; TAVARES, A.R.; AGUIAR, F.F.A.; KANASHIRO, S.; CHU, E.P.; STANCATO, G.C.; HARDER, I.C.F. Efeito de Ana, 6 BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, bromélia nativa da mata atlântica. **Revista Ceres**, v. 54(311), p. 063-067. 2007.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington. V.1, 555p. 1993.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> edition. Vol.1. Dordrecht, Netherlands. Springer. 501p. 2008.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P. de.; WANDERLEY, M. das. G. L.; BERG, C.V.D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61. 2005.

GIVNISH, T.J.; BARFUSS, M.H.J.; EE, RIINA, B.; SCHULTE, R.K.; HORRES, GONSISKA, R.P.A.; JABAILY, R.S. CRAYN, D.M.; SMITH, J.A.C.; WINTER, K.; BROWN, G.K.; EVANS, T.M.; HOLST, B.K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P.E.; SYTSMA, K.J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v.98, n.5, p.872-895. 2011.

GOEDERT, C. de O. Histórico e avanços em recursos genéticos no Brasil. In: NASS, Luciano L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 23-59. 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.1, p.183-260. 1998.

HUANG, P. L.; LIAO, L. J.; TSAI, C. C.; LIU, Z.H. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 105, p. 73-78. 2011.

KANASHIRO, S.; de CÁSSIA SALVADOR RIBEIRO, R.; GONÇALVES, A.N.; DEMÉTRIO, V.A.; JOCYS, T.; TAVARES, A.R. Effect of calcium on the *in vitro* growth of *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith plantlets. **Journal of Plant Nutrition**, v. 32, n. 5, p. 867-877, 2009.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: CBAB/EMBRAPA, 1998. p. 519-531

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, ed.2. 431p. 2008.

KIEVITSBOSCH, T.J. **Cultivo *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae com potencial ornamental**. 2011. 154 p. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e Ambiente). Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo- SP.

KISS, E.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L.E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, v. 30, p. 127-129, 1995.

LIMA, C.O. de. C.; MARCHI, M.N.G.; LIMA-BRITO, A.; CARNEIRO, C.E.; BELLINTANI, M.C.; SANTANA, J.R.F. de. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 249-254, 2012.

LIMA, E. da. C.A. **Propagação clonal *in vitro* de abacaxizeiros em sistema Dupla-fase e conservação de germoplasma sob regime de crescimento mínimo**. 2009. 82 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Federal do Acre, Rio Branco-AC.

LUTHER, H.E. **An alphabetic list of Bromeliad Binomials**. The Marie Selby Botanical Gardens. 11<sup>a</sup> Ed. Sarasota, Florida: Bromeliad Society International, 114 p. 2008.

MACEDO, C.E.C. et al. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 501-504, 2003.

MACHADO, M.P.; CARVALHO, D.C. de. BIASI, L.A. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ em diferentes meios de cultivo e concentrações de ácido giberélico. **Scientia Agraria**, v. 5, n. 1-2, p. 69-72, 2004.

MANETTI, L.M.; DELAPORTE, R.H.; LAVERDE JR, A. Metabólicos secundários da família bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1885-1897. 2009.

MARTINELLI, G. The Bromeliads of the Atlantic Forest. **Scientific American**, v. 282, pp. 86-93. 2000.

MENDES, G.C.; SOARES, C.Q.G.; BRAGA, V.F.; PINTO, L.C.; SANTANA, R.; VICCINI, L.F.; PEIXOTO, P.H.P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 972-974, 2007.

MENGARDA, G.; HILDA, L.; POVOAS, L.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de bromeliaceae. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 6, p. 469-474. 2009.

MOLLO, L.; MARTINS, M.C.M.; OLIVEIRA, V.F.; NIEVOLA, C.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: published on line 1July 2011.

MORAES, L. K. A. de.; FELISBINO, C. CRESTANI, L.; SILVA, A. L. da. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Pyrus calleryana* D-6 em sistema de cultura ‘dupla-fase’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n.3, p. 403-405, 2004.

MORALES, J.F. Bromeliaceae. In: Hammel, B.E.; Zamora, N. y Grayum, M.H. (eds.). **Manual de Plantas de Costa Rica**. Missouri Bot. Gard. Press, St. Louis & Inst. Nac. de Biodiversidade, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica (en preparación). Disponível em: <<http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?-DB=ubipub.fp3&-lay=WebAll&Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=888&-Find>>. Acesso em: 08 abr. 2013.

MOREIRA, B.A.; WANDERLEY, M.G.L.; CRUZ-BARROS, M.A.V. **Bromélias: Importância ecológica e diversidade. Taxonomia e Morfologia**. 2006. 12 p. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Curso de Capacitação de monitores e educadores. Jardim Botânico de São Paulo, São Paulo, 2006.

MOREIRA, M.J.S. Conservação *in vitro* de bromeliáceas. 2008. 67 p. Dissertação (Mestrado) - Ciências Agrárias. Área de Concentração: Fitotecnia. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- BA.



- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473 – 497. 1962.
- NARA, A.K.; WEBBER, A.C. Biologia floral e polinização de *Aechmea beeriana* (Bromeliaceae) em vegetação de baixio da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v.3 2, n. 4, p. 571-588. 2002.
- NASCIMENTO, M. G. A. **Morfogênese *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana***. 2007. 42 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- BA.
- NIEVOLA, C.C.; MERCIER, H.; MAJEROWICZ, N. Urea – A possible source of organic nitrogen for tank bromeliads. **Bromélia**, v. 6, n. 1-4, p. 44-48, 2001.
- OLIVEIRA, P.D. **Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev.) cv. Orange reagen**. 1994. 116 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG.
- OLIVEIRA, Y. de.; ANSELMINI, J.I.; CUQUEL, F.L.; PINTO, F.; QUOIRIN, M. Pré - aclimatização *in vitro* de abacaxi – ornamental. **Ciências Agrotecnológicas**, v. 34, Edição Especial, p. 1647 – 1653. 2010.
- PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 74p. 2001.
- PAULA, C.C. Cultivo de bromélias. **Aprenda Fácil**, Viçosa. 1390. 2000.
- PEDROSO, A.N.V.; LAZARINI, R.A.M.; TAMAKI, V.; NIEVOLA, C.C. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 3, p. 407-414. 2010.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do ágar. **Revista Ceres**, v. 42, p. 431-443. 1995.
- PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; RODRIGUES, H.C.A.; BERTOLUCCI, S.K.V.; LAMEIRA, O.A. Micropropagation of the Fiber-rich Amazonian Species *Ananas erectifolius* (Bromeliaceae), **Hort Science**, v.43, n. 7. p. 2134-2137, 2008.
- PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1035-1043. 2003.
- PEREIRA, J.E.S.; LIMA, E.C.A.; SILVA, T.L.; MESQUITA, A.G.G.; MACIEL, S.A.; COSTA, F.H.S. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 109, p. 263-269. 2012.
- PICKENS, K.A.; AFFOLTER, J.M.; WETZSTEIN, H.Y. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. **Hort Science**, v. 38, n.1, p. 101-104, 2003.
- PICKENS, A.K; WOLF, J.; AFFOLTER, J.M.; WETZSTEIN, H.Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *in vitro*. **Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 42, p. 348-353, 2006.

PIRES, M.V. Respostas morfo-fisiológicas de espécies ornamentais de *Passiflora* ao sombreamento. 2008. 114 p. Dissertação (Mestre em Produção vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. Ilhéus-BA.

POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. *Ex situ* conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 273-279, 2004.

POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* (Hassler), sob diferentes concentrações de AIB, **Floresta & Ambiente**, v. 12, n. 2, p. 42-49, 2005.

PULLMAN, G.S.; SKRYABINA, A. Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. **Plant Cell Rep**, v. 26, p. 873-887. 2007.

QUARESMA, A.C.; JARDIM, M.A. Diversidade de bromeliáceas epífitas na área de Proteção Ambiental Ilha do Combu, Belém, Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26 (2), p. 290-294. 2012.

RECH, A.R.; ROSA, Y.B.C.J.; SILVA, H.M. da. Comportamento de dendróbio borboleta (*Dendrobium phalaenopsis* var. *compactum* C.T. White – Orchidaceae) sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Agrarian**, v. 3, n. 7, p. 84-87, 2010.

RECH FILHO, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. 2004. 74 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias Departamento de Fitotecnia Progama de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Florianópolis, SC.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO L.L. NODARI, R.O. LISCHKA, R.W. MÜLLER, C.V.; GUERRA, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity & Conservation**, v.14, p.1799-1808, 2005.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica**. (Flora Ilustrada Catarinense série 983) Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 559 p. 1983.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 816 p. 1999.

ROCHA, M.A.C. da.; COSTA, M.A.P.de.C.; SILVA, S.A.; LEDO, C.A.da.S.; MOREIRA, M.J.S.; BASTOS, L.P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.

ROCHA, M.A.C. **Multiplicação e conservação de bromeliáceas ornamentais**. 2010. 99 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias: Fitotecnia). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA.

ROCHA, P.K. **Desenvolvimento de bromélias em ambientes protegidos com diferentes alturas e níveis de sombreamento**. 2002. 111 p. Dissertação (Mestre em Agronomia. Área de Concentração- Irrigação e Drenagem). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo- Piracicaba- SP.

RODRIGUES, P.H.V.; LIMA, A.M.L.P.; AMBROSANO, G.M.B.; DUTRA, M. de. F.B. Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants. **Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)**, v. 62, n. 3, p. 299-301, 2005.

ROSA, S.S. **Propagação e Conservação *in vitro* de bromélias do gênero *Aechmea* de valor ornamental**. 2010. 88 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana- BA.

SÁ, A.J. **Avanços na propagação e conservação *in vitro* da Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) nativa da região nordeste**. 2009. 81 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas. Área de Concentração: Sustentabilidade em Agroecossistemas). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão- SE.

SANTA-ROSA, S.; SOUZA, F.V.D.; VIDAL, A.M.; LEDO, C.A. das. S.; SANTANA, J.R.F. de. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 112-118. 2013.

SANTOS, A. J.; BITTENCOURT, A.M.; NOGUEIRA, A.S. Aspectos econômicos da cadeia produtiva das bromélias na região metropolitana de Curitiba e litoral Paranaense. **Floresta**, v. 35, n. 3, p. 409-417. 2005.

SANTOS, D.S. dos. **Micropropagação da bromélia ornamental *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch e a influência do etileno**. 2009. 133 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade vegetal e Meio Ambiente. Área de concentração: Plantas Vasculares em Análises Ambientais). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo- SP.

SANTOS, D.S. dos.; TAMAKI, V.; NIEVOLA, C.C. In vitro propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schultz F.) Klotzsch via nodal segments. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, v. 46, p. 524 – 529. 2010.

SCHEIDT, G.N.; SILVA, A.L.L. da.; DRONK, A.G.; BIASI, L.A.; ARAKAKI, A.H.; SOCCOL, C.R. Multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) em diferentes sistemas de cultivo. **Biociências**, v. 17, n. 1, p. 82-85, 2009.

SCHERER, R.F.; GARCIA, A.C.; FRAGA, H.P.F.; DAL VESCO, L.L.; STEINMACHER, D.; GUERRA, M.P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas cosmosus* var. *cosmosus*). **Scientia Horticulturae** 151: 38-45. 2013.

SILVA, A.L.L. da.; BISOGNIN, D.A.; DORNELLES, E.B.; WALTER, J.M.; FRANCO, E.T.H. Ensaios sobre o alongamento de brotos de *Dyckia marítima* Baker dispostos em agrupamentos – Bromeliaceae. **Caderno de pesquisa Ser. Bio**, v. 13, n. 2, p. 37-46, 2004.

SILVA, A.L.L. da.; FRANCO, E.T.H.; WALTER, J.M.; BISOGNIN, D.A.; CALGAROTO, N.S. Aclimatização de clones de *Dyckia marítima* em diferentes substratos – Bromeliaceae. **Revista Brasileira Agrociência**, v.12, n. 4, p. 495-498, 2006.

SILVA, A.L.L. da.; FRANCO, E.T.H.; DORNELLES, E.B.; BORTOLI, C.L.R.; QUOIRIN, M. *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). **IHERINGIA, Série Botânica**, v. 64, n. 2, p. 151-156, 2009.

SILVA, A.L.L. da.; COSTA, J. da. L.; ALCANTRA, G.B. de.; CARVALHO, D.C.de.; SCHUCK, M.R.; BIASI, L.A.; SCHEIDT, N.; SOCCOL, C.R. Micropropagation of *Nidularium innocentii* LEM. And *Nidularium procerum* LINDM (BROMELIACEAE). **Pak. J. Bot.**, v. 44, n. 3, p. 1095-1101, 2012.

SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. DE. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, **Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, S.M.G. **Reguladores vegetais no desenvolvimento *in vitro* de bromélia (*Aechmea blanchetiana*)**. 2010. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Área de concentração: Horticultura. Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu- SP.

SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; PELACANI, C. R.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. da. S.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation and *in vitro* Conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 923-932. 2009.

SILVEIRA, D. G.; VIDAL, A. M.; LEDO, C. A. da. S.; SANTANA, J. R. F.; SOUZA, F. V. D. Aspectos morfofisiológicos na pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 44, n. 3, p. 544-553, 2013.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Plaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1416-1423, 2006.

SMITH, L.B. The Bromeliaceae of Brazil. **Smithsonian Misceleneaus Collection**, v.126, n.1, p. 144-157, 1955.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Bromelioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica Monograph**, v.14, p. 1493-2142, 1979.

SOUZA, F.V.D. *et al.* Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromélias. In: JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A, da. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**, Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 177 – 205.

SOUZA, G.M.; WANDERLEY, M.G.L. *Aechmea rodriguesiana* (L.B.Sm.) L.B.Sm. (Bromeliaceae) uma espécie endêmica da Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, v.37, n.4, p. 517- 520. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 819 p.

TAMAKI, V.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C.C. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. **Hoehnea**, v. 34, p. 67-73, 2007.

TAMAKI, V.; CARVALHO, C.; PAULA, S.M.; KANASHIRO, S. Soluções nutritivas alternativas para o cultivo de bromélias ornamentais. **O mundo da saúde**, v. 35, n.1, p. 91-97, 2011.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v. 1. Brasília: Embrapa, 1998. 864 p.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v. 2. Brasília: Embrapa, 1999. 509 p.

VERSIEUX, L.M; WENDT, T; LOUZADA, R.B; WANDERLEY, M.G.L. Bromeliaceae da cadeia do espinhaço. **Megadiversidade**, v.4, n.1-2, p. 98-110. 2008.

VOLTOLINI, C.H.; SANTOS, M. Variações na morfoanatomia foliar de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii*. (Bromeliaceae) sob distintas condições ambientais. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 1, p. 2-10, 2011.

ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulturae**, v. 393, n1, p. 25-38. 1995.

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/quimica/culttec.htm>>. Acesso em: 03 mar. 2013.